

**Generierung von Killer-artifiziellen-antigenpräsentierenden
Zellen (KaAPC) zur antigenspezifischen Eliminierung von
humanen primären CD8⁺ zytotoxischen T Lymphozyten *in vitro***



Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
- Biologie und Vorklinische Medizin -
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Dipl. Biol. Christian Schütz

Regensburg 2009

Das Promotionsgesuch wurde am 21.04.2009 eingereicht.

Die Arbeit wurde angeleitet von: Herrn Prof. Dr. M. Fleck

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:	Herr Prof. Dr. A. Kurtz
1. Gutachter:	Herr Prof. Dr. R. Warth
2. Gutachter:	Herr Prof. Dr. M. Fleck
3. Prüfer:	Herr Prof. Dr. S. Schneuwly

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitates gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwertige Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt

Regensburg, den 21.04.2009

(Christian Schütz)

„NATURE! ...

Life is her most exquisite invention;
and death is her expert contrivance to get plenty of life.“

T.H.Huxley, Nature, 4. November 1869

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	4
1. EINLEITUNG.....	7
1.1 Das Immunsystem.....	7
1.2 Toleranz.....	9
1.2.1 Zentrale Toleranz.....	9
1.2.2 Periphere Toleranz.....	10
1.2.2.1 Allgemeine Mechanismen	10
1.2.2.2 Zelluläre Mechanismen.....	11
1.3 Allo gene Immunreaktionen.....	13
1.4 Autoimmunkrankheiten	14
1.5 Wissenschaftliche Ansätze zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen	15
1.5.1 Zellbasierte experimentelle Ansätze	16
1.5.2 Artifiz ielle experimentelle Ansätze	19
1.6 Zielsetzung der Arbeit	21
2. MATERIAL UND METHODEN.....	22
2.1 Material.....	22
2.1.1 Medien, Puffer und Lösungen	22
2.1.2 Farbstoffe	23
2.1.3 HLA-A ₂ restringierte Peptide	23
2.1.4 Peptid HLA-A*0201 Tetramere	24
2.1.5 Antikörper und dimere Moleküle	24
2.1.6 „beads“	25
2.1.7 Zellkulturflaschen, -platten, -röhrchen.....	25
2.1.8 Software und Internetportale	26
2.2 Methoden	26
2.2.1 Allgemeine Methoden	26
2.2.1.1 Primärzellen.....	26
2.2.1.1.1 Kultivierung von Zellen.....	26

2.2.1.1.2 Zentrifugation von Zellen	26
2.2.1.1.3 Zellzahlbestimmung	27
2.2.1.1.4 Kryokonservierung von Zellen	27
2.2.1.1.5 Auftauen von Zellen	27
2.2.1.2 „beads“	28
2.2.1.2.1 Generierung von KaAPC und Kontrollbeads (c.b.)	28
2.2.1.2.2 Generierung von aAPC	29
2.2.1.2.3 Einstellen der „bead“-Konzentration	30
2.2.1.2.4 Lagerung der funktionellen „beads“	30
2.2.1.2.5 Beladung der funktionellen „beads“	30
2.2.1.3 Herstellung des TCGF	31
2.2.2 Primärzellgewinnung und -bearbeitung	32
2.2.2.1 MNC-Gewinnung aus Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation	32
2.2.2.2 T-Zell-Gewinnung mittels Gegenstromisolation	32
2.2.2.3 Magnetische Separation zur Gewinnung von humanen, naiven CD8 ⁺ CTL	33
2.2.2.4 Generierung von humanen, antigenspezifischen CD8 ⁺ CTL	34
2.2.3 Funktionelle Analysen	35
2.2.3.1 Kokultorexperimente	35
2.2.3.1.1 Kokultur von humanen, primären CTL mit funktionellen „beads“	35
2.2.3.1.2 Zytokinassay	36
2.2.3.1.3 CD107a Assay	36
2.2.3.2 Durchflusszytometrie	36
2.2.3.2.1 Antikörperfärbung	37
2.2.3.2.2 Apoptosefärbung	37
2.2.3.2.3 MHC-Tetramerfärbung	38
2.2.3.2.4 PKH67/26 Färbung	39
3. ERGEBNISSE	40
3.1 Konzept der Killer-artifiziellen-antigenpräsentierenden Zelle (KaAPC)	40
3.2 Wahl des richtigen T-Zell-Kokulturmediums	43
3.3 Ausschaltung der Effekte löslichen Peptids auf die CTL-Kokulturen	44
3.3.1 Peptidtitrationskurve	45
3.3.2 Untersuchung der Waschkonditionen für die funktionellen KaAPC und Kontrollbeads	46
3.4 Titration des funktionellen KaAPC-Phänotyps	48
3.5 Funktionelle Charakterisierung des optimalen KaAPC-Phänotyps	51
3.5.1 Durchflusszytometrischer Phänotyp	51
3.5.2 Antigenspezifische Depletion von CTL	53
3.5.3 Die KaAPC Funktion ist abhängig vom KaAPC : CTL Verhältnis	55

3.5.4 Die KaAPC Funktion ist zeitabhängig	56
3.5.5 Die KaAPC vermittelte Depletion antigenspezifischer CTL führt nicht zur Aktivierung von CTL und ist nicht TNF- α abhängig	58
3.5.5.1 CD107a Assay	58
3.5.5.2 TNF- α Sekretion und Blockierung	59
3.5.6 KaAPC vermittelte antigenspezifische Elimination von CTL in T-Zellkulturen unterschiedlicher Antigen-spezifität	62
3.5.6.1 Etablierung einer neuen durchflusszytometrischen Methode zur Vitalitätsbestimmung von CTL unterschiedlicher Antigen-spezifität	62
3.5.6.2 Formaler Nachweis der KaAPC vermittelten antigenspezifischen Depletion von CD8 ⁺ T-Zellen aus T-Zellmischkulturen unterschiedlicher Antigen-spezifität	65
4. DISKUSSION	67
4.1 Depletion antigenspezifischer CTL durch FasL-exprimierende-APC	67
4.2 Die artifizielle-antigenpräsentierende Zelle (aAPC)	68
4.3 Die KaAPC-Plattformtechnologie.....	72
4.3.1 Prinzip der KaAPC und Optimierung der Versuchsbedingungen.....	72
4.3.2 Funktionelle Charakteristika des optimalen KaAPC-Phänotyps.....	73
4.3.3 Hinweise auf die molekulare Funktionsweise der KaAPC.....	74
4.3.4 Vorteile und Potential der KaAPC-Technologie	76
4.4 Ausblick.....	77
ZUSAMMENFASSUNG	80
PUBLIKATIONSLISTE	82
LITERATURVERZEICHNIS	86
ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	103
DANKSAGUNG	105

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-aminoactinomycin D
°C	Grad Celsius
μ	mikro (10 ⁻⁶)
Abb.	Abbildung
aAPC	künstliche antigenpräsentierende Zelle (<i>artificial antigen-presenting-cell</i>)
AK	Antikörper
ALPS	Autoimmun Lymphoproliferatives Syndrom
APC	antigenpräsentierende Zelle, oder Allophycocyanin
AS	Aminosäure
BSA	Bovine serum albumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAD	<i>caspase-specific DNase</i>
cAMP	Zyklisches Adenosine Monophosphat (<i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalie Virus
CTL	Zytotoxische T-Zellen (<i>cytotoxic T-cells</i>)
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte assoiated Antigen 4</i>
DC	Dendritische Zellen (<i>dentritic cells</i>)
DD	<i>death domain</i>
dim	vermindert (<i>diminished</i>)
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERG	Eppendorfreaktionsgefäß
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum

FOXP3	<i>Forkhead box p3</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
g	Gramm
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
H ₂ O _{bdest}	zweifach destilliertes Wasser aus einer Millipore Anlage
ICAD	<i>inhibitor of caspase specific DNase</i>
iDC	immature dendritische Zellen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILT-3	<i>immunoglobulin-like transcript-3</i>
ILT-4	<i>immunoglobulin-like transcript-4</i>
IPEX	<i>immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy syndrome</i>
k	kilo
KaAPC	Killer-artifizielle-antigenpräsentierende-Zelle (<i>killer-artificial-antigen-presenting-cell</i>)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LAG-3	Lyomphozyten Aktivierungsgen-3 (<i>lymphocyte activation gene-3</i>)
LFA-1	Lymphozytenfunktion assoziiertes Antigen 1 (<i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>)
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
m	Meter oder Milli
M	Molar (Mol pro Liter)
MACS	<i>magnetic cell separation</i>
mDC	mature dendritische Zellen
MFI	Mittlere Floureszenzintensität (<i>mean fluorescence intensity</i>)
mHA _g	Nebenhistokomptibilitätsantigene (<i>minor histocompatibility antigens</i>)
MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (<i>major-histocompatibility complex</i>)
min	Minute
ml	Milliliter
n	Nano (10 ⁻⁹)
n.d.	nicht detektiert (<i>not detected</i>)

NK	Natürliche Killer (-Zellen)
NKT	Natürliche Killer T (-Zellen)
PBMC	Periphere Blutmononukleäre Zellen
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
Pc5	Peridinin chlorophyll protein-cyanin 5.5
PD-1	<i>Programmed Death 1</i>
PE	Phycoerithrin
PFA	Paraformaldehyd
pH	Konzentration der H ⁺ -Ionen in einer Lösung
PHA	Lectin von <i>Phaseolus vulgaris</i>
PI	Propidium Iodid
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
pmol	Picomol
rpm	Umdrehung pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
sek.	sekundär
SCID	<i>severe combined immunodeficiency disease</i>
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
SSC	<i>Side scatter</i>
Strep	Streptavidin
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zellrezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TCGF	T Zellen Wachstumsfaktor (<i>T cell growth factor</i>)
TGF-β	<i>transforming growth factor β</i>
TNF-α	Tumor-Nekrosis-Faktor alpha (<i>tumor necrosis factor alpha</i>)
TNP	Trinitrophenyl
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
T _{reg}	T-regulatorische Zelle (<i>T regulatory cell</i>)
U	Enzymeinheit (<i>Units</i>)
ü.N.	über Nacht
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem bezeichnet ein komplexes System aus einer Vielzahl von verschiedenen, hochspezialisierten Zellen, die über den gesamten Organismus verteilt sind. Ihre Aufgabe ist die Erkennung und Beseitigung von Krankheitserregern oder entarteter, körpereigener Zellen. Dieses „Organsystem“ setzt sich aus zwei miteinander sehr eng verwobenen Systemen zusammen. Dem evolutionär älteren angeborenen Immunsystem und dem erst bei Wirbeltieren auftretenden erworbenen Immunsystem.

Das angeborene Immunsystem ist die erste und schnellste Verteidigungslinie des Körpers. Es besteht neben rein physikalischen Barrieren, wie Mucus und den Epithelien, aus einer Vielzahl von biochemischen und zellulären Abwehrmechanismen. Überwindet ein Krankheitserreger die Epithelbarriere und dringt in den Körper ein, so wird er dort von den Effektorzellen des angeborenen Immunsystems (Granulozyten, Phagozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen)) mittels spezieller, keimbahnkodierter Rezeptoren aufgrund seiner mikrobieller Moleküle erkannt. Dies führt zur Phagozytose des Krankheitserregers durch Makrophagen und Granulozyten und anschließend zur Lyse. Die von diesen Zellen sezernierten Botenstoffe vermitteln dann die Auslösung einer Entzündungsreaktion, die in Verbindung mit dem ebenfalls aktivierten Komplementsystem zur Abwehr des Krankheitserregers führt. Sollte der Krankheitserreger jedoch pathogen sein, d.h. das angeborene Immunsystem überwinden, so würde dies zur Ausbreitung des Erregers im Organismus führen¹.

Als Gegenmaßnahme zur Abwehr solcher pathogener Erreger entwickelte sich das erworbene bzw. adaptive Immunsystem. Wie der Name andeutet, besitzt es eine faszinierend hohe Flexibilität in seiner Anpassung an die unterschiedlichsten Krankheitserreger. Dabei erkennen die Lymphozyten spezielle Strukturen der Erreger, die Antigene, mittels hoch spezifischer Rezeptoren. Diese sind klonalen Ursprungs und entstehen aus einem sehr großen Reservoir an unterschiedlichen Spezifitäten, welche durch somatische Rekombination verschiedener Gensegmente während der Reifung der Lymphozyten determiniert werden².

Das erworbene Immunsystem untergliedert sich in die humorale und die zellvermittelte Immunantwort. Die humorale Immunantwort wird durch spezielle Moleküle, die Antikörper, generiert. Diese in B-Zellen und Plasmazellen produzierten Antikörper sind in der Lage, die einzelnen Erreger spezifisch mittels ihrer Antigene zu binden und zu opsonieren. Solche

opsonierten Erreger können dann wiederum von Phagozyten erkannt und phagozytiert werden. Die anschließende Lyse kann dann zur Produktion von Botenstoffen führen, die eine Entzündungsreaktion unterstützen. Bei der zellvermittelten Immunantwort kommt es zur Erkennung und anschließender Lyse von viral oder bakteriell infizierten Zellen sowie entarteter körpereigener Zellen durch $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen (CTL). Ebenso produzieren $CD4^+$ Helfer-T-Zellen nach Antigenerkennung Zytokine, die zur Proliferation und Differenzierung von Effektorzellen führen³.

Eine wichtige Verbindung zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem stellen die „professionellen“ antigenpräsentierenden Zellen (APC) dar. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um dendritische Zellen (DC), aber auch B-Zellen und Makrophagen, welche nach Phagozytose pathogenes Material prozessieren und deren Antigene T-Zellen präsentieren^{4,5}. Dabei können naive T-Zellen über ihren T-Zellrezeptor (TCR) die von den APC auf HLA- (Humanes Leukozyten Antigen) Klasse-I- und Klasse-II-Molekülen präsentierten Antigene erkennen und werden dadurch antigenspezifisch aktiviert. Für eine vollständige Aktivierung benötigen jedoch die T-Zellen noch eine Stimulation durch kostimulatorische Moleküle⁶, insbesondere der B-7 Familie oder durch ICOS-Ligand („*inducible co-stimulation ligand*“)⁷. Diese werden nach der Phagozytose und Prozessierung der Erreger auf der Zelloberfläche von z.B. DC verstärkt exprimiert⁸. Nach der vollständigen Aktivierung der T-Zellen beginnt deren klonale Expansion und die Sezernierung von Zytokinen. Die Summe der auto- und parakrinen Zytokineffekte führt zur Reifung von antigenspezifisch aktivierten T-Zellen zu Effektorzellen, die wiederum in der Lage sind, Zellen des angeborenen Immunsystems zu aktivieren. $CD8^+$ CTL und Makrophagen werden somit in die Lage versetzt, Krankheitserreger und infizierte Zellen zu beseitigen und im Falle von B-Zellen führt eine solche Aktivierung zur Produktion von Antikörpern⁹ und durch den späteren Wechsel der Immunglobulinklassen von IgM zu IgG¹⁰ zur Ausbildung eines humoralen, immunologischen Gedächtnisses.

Nach der vollständigen Eradizierung des Krankheitserregers aus dem Organismus, muss die Menge der durch klonale Expansion entstandenen Zellen wieder in den Ausgangszustand (Homöostase) zurückgeführt werden¹¹. Ein geringer Teil der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen wie auch B-Zellen differenzieren zu Gedächtniszellen aus. Diese Zellen können jahrelang im Organismus überleben und lösen bei erneutem Kontakt mit demselben Antigen eine schnellere und wirksamere sekundäre Immunantwort aus^{2,12,13}. Der jedoch weitaus größere Teil der aktivierten Zellen des angeborenen Immunsystems wird durch aktivierungsinduzierten Zelltod (AICD) eliminiert^{14,15}. Dies geschieht durch eine Form des

programmierten Zelltods, der Apoptose, welche hauptsächlich durch Fas/FasL (CD95/CD95L) Interaktion ausgelöst wird¹⁶⁻¹⁸. Weitere beschriebene Mechanismen werden durch TNF- α ¹⁹ oder TRAIL²⁰ vermittelt, aber auch durch Mechanismen, die unabhängig von einer Caspase-Aktivierung ablaufen²¹. Als passiver Eliminierungsmechanismus wird die fehlende Versorgung der Lymphozyten mit essentiellen Wachstumsfaktoren bezeichnet und kann ebenfalls zur Wiederherstellung der Homöostase beitragen²².

1.2 Toleranz

Die Aufgaben des Immunsystems sind hoch spezifisch. Es ist angelegt auf die Bekämpfung pathogener Erreger oder entarteter körpereigener Zellen. Doch wie kann es sicherstellen, dass nur tatsächlich Fremdes als fremd erkannt wird und nicht versehentlich körpereigene, gesunde Zellen eliminiert werden? Die Mechanismen, die diese Unterscheidung ermöglichen, werden als Toleranz bezeichnet und untergliedern sich in zentrale und periphere Toleranzmechanismen. Toleranz ist definiert als die Summe aller Mechanismen, die eine Immunantwort gegenüber eines Antigens oder mehrerer spezifischer Antigene unterbindet, wobei jedoch keine generelle oder durch endogene bzw. exogene Einflüsse induzierte Immunsuppression vorliegen darf. Es müssen also gleichzeitig Immunantworten gegenüber relevanten Antigenen in ihrem vollen Umfang und Stärke induzierbar sein.

1.2.1 Zentrale Toleranz

Mittels der zentralen Toleranz soll sichergestellt werden, dass nur reife Lymphozyten die primären lymphatischen Organe verlassen (T-Zellen aus dem Thymus, B-Zellen aus dem Knochenmark), die mit ihren bis zu potentiell 25 Mio. unterschiedlichen TCR²³ keine Autoantigene erkennen^{24,25}. Um dies zu erreichen, werden Lymphozyten, die eine hohe Affinität zu Autoantigenen aufweisen und somit potentiell autoreaktiv sind, durch Apoptose zerstört (negative Selektion)^{26,27}. Die Präsentation der Autoantigene erfolgt im Thymus auf APC. Da jedoch viele Autoantigene nur gewebsspezifisch gebildet werden²⁸⁻³⁰ und somit nicht durch APC im Thymus präsentiert werden können, ist die zentrale Toleranz allein nicht ausreichend um Autoreaktivität zu verhindern. Es müssen also zusätzliche Mechanismen vorhanden sein, die in der Peripherie Toleranz induzieren können^{31,32}.

1.2.2 Periphere Toleranz

Die periphere Toleranz wird hauptsächlich durch positive Selektion vermittelt und nicht wie bei der zentralen Toleranz durch negative Selektion. Hierbei wird die Aktivität eines T-Lymphozyt mit hoher Bindungsaffinität für ein präsentierte Antigen reguliert.

1.2.2.1 Allgemeine Mechanismen

Periphere Toleranz wird bei T-Zellen entweder durch intrinsische oder durch extrinsische Faktoren hergestellt³³. Die einfachste Möglichkeit, Autoreaktivität zu verhindern, liegt in dem beschränkten Zugang von Lymphozyten zu körpereigenen Antigenen^{34,35}. Überdies werden diese Antigene zumeist nur in sehr geringen Mengen exprimiert, was nicht zur Aktivierung der Lymphozyten ausreicht³⁶. Um Anergie, das heißt die funktionelle Inaktivität, die auch nach späterer optimaler Stimulation nicht wieder aufgehoben werden kann³⁷⁻³⁹ bei T-Zellen zu verhindern, benötigen diese neben der Aktivierung des TCR auch kostimulatorische Signale^{6,40-42}.

Toleranz kann jedoch nicht nur indirekt über das Fehlen eines kostimulatorischen Signals, sondern auch direkt über inhibitorische Rezeptoren induziert werden. Sowohl CTLA-4 als auch PD-1 sind Mitglieder der B7-CD28 Familie und können mittels ihrer inhibitorischen Signale Anergie in T-Zellen induzieren^{43,44}. Überdies kann das Fehlen von CTLA-4 zu heftigen Autoimmunreaktionen, Infiltration und Zerstörung vieler Gewebe bis hin zum Tod führen^{45,46}. Mutationen dieses Rezeptors erhöhen die Wahrscheinlichkeit an Autoimmunthyreoiditis oder Diabetes mellitus Typ-I (T1D) zu erkranken⁴⁷. Für den T1D trifft diese erhöhte Wahrscheinlichkeit auch bei Polymorphismen im PD-1 Gen zu, aber auch ein systemischer Lupus erythematodes (SLE) lässt sich bei Menschen mit diesen Polymorphismen gehäuft nachweisen^{48,49}.

Periphere Toleranz kann auch durch klonale Deletion von autoreaktiven T-Zellen erreicht werden. Dabei wird die Depletion, nach wiederholter Antigenstimulation durch auto- oder parakrine Faktoren, ausgelöst¹⁷. Eine bedeutende Rolle spielt hier die Fas/FasL vermittelte Apoptoseinduktion⁵⁰, die sowohl in dem gleichen (auto), als auch in dem benachbarten (para) T-Zellen induziert werden kann⁵¹. Auch die Depletion autoreaktiver T-Zellen durch FasL⁺ Makrophagen und DC ist beschrieben worden^{52,53}. Besondere Bedeutung kommt dem FasL in immunprivilegierten Organen, wie dem Auge, den Hoden und dem zentralen Nervensystem zu. Indem FasL dort konstitutiv exprimiert wird, wird dadurch eine T-zellabhängige Immunantwort und die damit einhergehende irreversible Schädigung des Gewebes

verhindert^{54,55}. Mutationen im Fas/FasL-Signalweg sind Ursache für das Autoimmun-Lymphoproliferative-Syndrom (ALPS) und gehen einher mit Lymphadenopathie, Splenomegalie und verschiedenen anderen Autoimmunphänomenen^{56,57}.

1.2.2.2 Zelluläre Mechanismen

CD4⁺ T-Zellen

Zellen, die periphere Toleranz induzieren können und dabei nicht nur eine bedeutende Rolle bei der Selbsttoleranz, sondern auch beim kontrollierten Ablauf von Immunantworten gegenüber Tumoren, Allergenen, Mikroben, Transplantaten sowie dem Fötus bei der Schwangerschaft spielen, nennt man regulatorische T-Zellen⁵⁸⁻⁶¹. Zu den am besten charakterisierten regulatorischen T-Zellen werden die CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen gerechnet. Sie machen ungefähr 2 % der gesamten CD4⁺ T-Zellen eines Menschen aus und zeichnen sich durch die konstitutive Expression der α -Kette des Interleukin-2 (IL-2)-Rezeptors aus⁶²⁻⁶⁴. Ebenso exprimieren diese Zellen konstitutiv den Transkriptionsfaktor FOXP3, der für die Funktion und die Entstehung regulatorischer T-Zellen von besonderer Bedeutung ist^{65,66}. Regulatorische T-Zellen können die Aktivierung, Proliferation und die Effektorfunktionen von T-Zellen unterdrücken⁶⁷. Somit können Fehlfunktionen innerhalb dieser regulatorischen T-Zellen die Ausbildung verschiedenster Autoimmunphänomene begünstigen⁶⁸⁻⁷⁰. So kann der Verlust des FOXP3 Gens beim Menschen zu IPEX führen^{71,72}, wohingegen eine Überexpression des FOXP3 - Gens in naiven CD4⁺ T-Zellen zu unerwünschten suppressiven Effekten, ähnlich der, der regulatorischer T-Zellen, führt⁶⁵.

Regulatorische T-Zellen reifen im Thymus, können jedoch auch in der Peripherie aus naiven CD4⁺ T-Zellen gebildet werden⁶³. Durch eine TGF- β verstärkte und durch IL-2 verminderte^{73,74} Differenzierung können naive T-Zellen nach einer schwachen Stimulation ihres TCR in Verbindung mit einem kostimulatorischen Signal zu Foxp3 exprimierenden CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen differenzieren⁷⁵. Diese sind dann, genauso wie die im Thymus gereiften regulatorischen T-Zellen in der Lage, Immunreaktionen über einen Zell-Zell-Kontakt abhängigen Mechanismus zu inhibieren⁷⁶.

Neben der Unterdrückung der Proliferation, der Inhibition der Aktivierung und der Zytokinproduktion von T-Zellen, können regulatorische T-Zellen auch die Expansion, die Immunglobulinproduktion und den Isotypenwechsel von B-Zellen verhindern⁷⁷⁻⁸⁰. Ebenso inhibieren sie die Zytotoxizität der NK- und NKT-Zellen, sowie die Reifung und Funktion der

DC⁸¹⁻⁸³. Der exakte Mechanismus der Suppression ist bis heute noch nicht zur Gänze geklärt⁸⁴, jedoch konnte gezeigt werden, dass die Blockade der Oberflächenmoleküle CTLA-4 und LAG-3 die suppressiven Funktionen der regulatorischen T-Zellen vermindern⁸⁵. Ebenso scheinen an diesem Zell-Zell-Kontakt abhängigen Mechanismus die Zytokine IL-10 und TGF- β entscheidend beteiligt zu sein^{63,81,86-89}, so wie die Ektoenzyme CD39, CD73 und cAMP^{90,91}.

Da eine überschießende Suppression den Organismus anfällig für Infektionen und Malignome machen würde^{58,92}, beinhaltet das Immunsystem ebenfalls Mechanismen, die der Suppression durch regulatorische T-Zellen entgegenwirken. So sind Effektorzellen nach einer starken α -CD3 Antikörperstimulation resistent gegenüber einer Suppression ihrer Funktion⁹³. Auch wirken hohe Konzentrationen von IL-2, IL-6, TNF sowie starke kostimulatorische Signale der Suppression entgegen^{78,94,95}.

Neben den bereits beschriebenen CD4⁺ CD25⁺ regulatorischen T-Zellen wurden bisher auch noch die Typ 3 T-Helferzellen (Th3) und regulatorische T-Zellen des Typ 1 (Tr1) beschrieben. Beide Subpopulationen besitzen über Zytokine vermittelte suppressive Eigenschaften, die nicht Zell-Zell-Kontakt abhängig sind. Dabei sezernieren Th3-Zellen hauptsächlich TGF- β , aber auch wenig IL-4 und IL-10. TGF- β wiederum fördert die Differenzierung von naiven T-Zellen in CD4⁺ CD25⁺ regulatorische T-Zellen⁹⁶. Tr1-Zellen sezernieren in erster Linie IL-10, welches durch seine immunsuppressive Wirkung die Aktivierung, die Zytokinproduktion und die Effektorfunktionen von T-Zellen unterdrücken kann⁹⁷⁻⁹⁹. Ebenso produzieren diese Zellen IFN- γ , geringe Mengen an IL-2 und kein IL-4¹⁰⁰, was sie von Th2-Zellen deutlich unterscheidet und ihre Rolle bei der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz unterstützt. So konnten sowohl bei Patienten mit rheumatoider Arthritis verminderte Frequenzen an Tr1-Zellen festgestellt werden¹⁰¹, als auch deren Rolle in Immunreaktionen gegen Transplantate, Allergene, Infektionen und Tumore nachgewiesen werden¹⁰²⁻¹⁰⁷.

CD8⁺ T-Zellen

Neben den CD4⁺ CD25⁺ regulatorischen T-Zellen sind auch CD8⁺ T-Zellen beschrieben worden, die immunregulatorische Funktionen aufweisen. Bei einer dieser Subpopulationen handelt es sich um CD8⁺ CD28⁻ T-Zellen. Diese Zellen konnten bei toleranten Patienten nach Herz-, Leber- und Nierentransplantaten nachgewiesen werden, waren jedoch bei Patienten innerhalb einer akuten Phase einer Abstoßungsreaktion nicht nachweisbar¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Es zeigte

sich, dass die durch wiederholte allogene oder xenogene Stimulation zu generierenden, HLA-Klasse-I restringierten $CD8^+ CD28^-$ T-Zellen die Proliferation von $CD4^+$ T-Zellen unterdrücken konnten¹¹¹. Dabei verhindern die $CD8^+ CD28^-$ T-Zellen die Aktivierung der APC durch Unterbindung der vermehrten Expression von kostimulatorischen Molekülen, wie CD80 und CD86 sowie der Adhäsionsmoleküle CD54 und CD58. Die APC differenzieren sich somit zu einem tolerogenen Phänotyp aus^{111,112}. Zusätzlich exprimieren diese APC inhibitorische Oberflächenmoleküle wie ILT3 und ILT4^{113,114}. Kommt es dann zur Zell-Zell-Kontakt abhängiger Interaktion dieser tolerogenen APC mit antigenspezifischen $CD4^+$ T-Zellen, wird in diesen Anergie induziert^{111,113}.

Eine weitere Subpopulation der $CD8^+$ regulatorischen T-Zellen kann in Gegenwart von IL-10 produzierenden Monozyten aus $CD8^+ CD28^-$ T-Zellen differenziert werden. Eine Differenzierung aus $CD8^+ CD28^+$ T-Zellen ist hingegen nicht möglich. Diese Subpopulation exprimiert vergleichbar wie die $CD4^+ CD25^+$ regulatorischen T-Zellen FOXP3 und vermittelt ihre suppressiven Funktionen durch die vermehrte Expression von IL-10^{115,116}. Dabei handelt es sich um die Inhibition der APC-Aktivierung und der Proliferation sowie der zytotoxischen Aktivität von T-Zellen¹¹⁷. Die Bedeutung der $CD8^+$ regulatorischen T-Zellen lässt sich leicht nachweisen bei Patienten mit Lungenkrebs¹¹⁶, sowie bei Patienten mit SLE in Remission. Jedoch konnten diese Zellpopulation nicht bei Patienten mit aktivem SLE nachgewiesen werden¹¹⁵.

1.3 Allogene Immunreaktionen

Für viele Patienten mit Organversagen auf Grund anatomischer oder funktioneller Störungen stellt eine Transplantation von Zellen, Gewebe oder ganzen Organen die einzige therapeutische Option dar. Nach erfolgter Transplantation ergibt sich jedoch das Problem einer durch das Immunsystem des Empfängers generierten heftigen Immunantwort, die gegen das Transplantat gerichtet ist und in vielen Fällen zur Abstoßung desselben führt. An Hand der Geschwindigkeit, der Mediatoren und der Effektoren der generierten Immunantwort kann man diese Abstoßungsreaktion in drei Stadien einteilen.

Innerhalb weniger Minuten bis Stunden nach erfolgter Allotransplantation kann es zu einer hyperakuten Abstoßung des transplantierten Organs kommen. Dabei binden Antikörper des Empfängers Oberflächenmoleküle des Transplantats und führen somit zur Aktivierung des Komplementsystems, was schließlich zur Ausbildung von Thrombosen, Ischämien, Nekrosen und Organverlust führt¹¹⁸. Eine erst nach ca. einer Woche auftretende akute

Abstoßungsreaktion wird hingegen durch die spezifischen Interaktionen von T-Zellen mit den entsprechenden Alloantigenen ausgelöst¹¹⁹. Auch hierbei kommt es zur Zerstörung des Transplantats. Chronische Abstoßungsreaktionen treten hingegen erst nach Monaten bis Jahren auf und werden sowohl durch T-Zellen, als auch durch Antikörper vermittelt. Sie führen über die Zeit zur Ausbildung einer Fibrose und Gefäßwandschädigungen, die ein chronisches Organversagen verursachen¹²⁰.

Ausschlaggebend für die Ausbildung einer Abstoßungsreaktion ist die Erkennung von fremden, polymorphen HLA-Molekülen (Alloantigenen) des Transplantats durch das adaptive Empfängerimmunsystem. Bei einer direkten Erkennung interagiert der TCR der Empfänger-T-Zellen mit dem HLA-Molekülen einer Spender-APC, ohne dass dieser zuvor von körpereigenen APC hätte aufgenommen und präsentiert werden müssen¹²¹. Die daraufhin einsetzende, sehr schnelle Immunantwort wird somit einzig durch das Vorhandensein von alloenen HLA-Molekülen ausgelöst. Eine hohe Frequenz der alloreaktiven T-Zellen begünstigt eine überschießende Immunreaktion ebenfalls. So erkennen etwa 7 % aller T-Zellen eines Individuums allogene HLA-Moleküle¹²². Bei einer indirekten Erkennung der Spender-HLA-Moleküle ist es jedoch erforderlich, dass diese den T-Zellen auf eigenen HLA-Molekülen der Empfänger-APC präsentiert werden, die erst dann eine Immunreaktion initiieren. Jedoch kann durch beide Mechanismen eine Transplantatabstoßung hervorgerufen werden^{123,124}.

Neben den HLA-Molekülen gibt es noch so genannte Nebenhistokompatibilitätsantigene (mHAg), polymorphe Proteine des fremden Gewebes, welche, wie bei einer indirekten Erkennung, durch eigene APC aufgenommen, prozessiert und den T-Zellen präsentiert werden müssen, bevor eine allogene Immunantwort initiiert werden kann¹²⁵.

1.4 Autoimmunkrankheiten

Ausschlaggebend für den Erfolg des Immunsystems bei der Abwehr von Krankheitserregern ist die fehlerfreie Erkennung von Fremdanigenen bei gleichzeitiger Toleranz gegenüber Autoantigenen. Ist dieser hoch komplexe Mechanismus gestört, kann es zu Schäden an einzelnen Organen oder dem gesamten Organismus kommen, die in ihrer Folge auch den Tod des Individuums nach sich ziehen können¹²⁶. Fehlerhafte Immunreaktionen gegen Autoantigene, die zu einer Gewebeschädigung führen, nennt man Autoimmunerkrankungen, die bei etwa 5 % der westlichen Bevölkerung in unterschiedlichster Ausprägung auftreten¹²⁷. Diese Immunreaktion zeichnen sich durch die Produktion von Autoantikörpern und der Aktivierung und Proliferation von autoreaktiven T-Zellen (gegen autologe Zellen, Proteine

und Gewebe) aus^{128,129}. Prinzipiell kann man beide Phänomene auch bei gesunden Individuen nachweisen, doch führen sie bei diesen nicht zur Schädigung des Gewebes^{28,29,130}, wie es für die Manifestation einer Autoimmunkrankheit in jedem Fall erforderlich ist¹³¹.

Autoimmunerkrankungen entstehen durch das gemeinsame Wirken verschiedenster Faktoren. Dabei ist sowohl die individuelle genetische Ausstattung als auch Zytokine, Korezeptoren, Apoptosefaktoren, kostimulatorische Signale und Umweltfaktoren von entscheidender Bedeutung^{129,132-134}. Auch bakterielle bzw. virale Infektionen können über molekulare Mimikry oder „bystander“-Effekte zur Ausbildung einer Autoimmunerkrankung beitragen¹³⁵. Einige der während einer solchen Infektion aktivierten T-Zellen weisen eine ausreichend hohe Affinität zu Autoantigenen auf, so dass diese, auch nach der Beseitigung des Krankheitserregers, von diesen Autoantigenen in ihrem aktivierten Zustand gehalten werden können. Doch sind auch Autoimmunerkrankungen beschrieben, deren vorrangige Ursache in der Mutation eines einzelnen Genes liegt^{56,136}. Allgemein spielen bei genetischen Mutationen die Gene des Fas/FasL-Signalwegs eine bedeutende Rolle in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen¹³⁷⁻¹³⁹. Aber auch fehlerhaft funktionierende regulatorische T-Zellen können Autoimmunkrankheiten auslösen¹⁴⁰. So weisen Patienten mit Multipler Sklerose, Typ-I-Diabetes mellitus (T1D) und Psoriasis verringerte Effektorfunktionen und Proliferation dieser T-Zellpopulation auf^{68,69,141}.

Die Entstehung einer Autoimmunerkrankung wird zu meist nur durch ein oder wenige fehlerhaft erkannte Autoantigene verursacht, jedoch kommt es mit fortschreitender Schädigung des Gewebes zu einer Zunahme der erkannten Autoantigene („*epitope spreading*“). Hervorgerufen wird diese Zunahme der erkannten Autoantigene durch die vermehrte Prozessierung und Präsentation von zerstörtem körpereigenem Gewebe auf APC, welche dann weitere autoreaktive T-Zellen aktivieren. Dies führt zu einer Verstärkung der Autoimmunreaktion und mündet in einem chronischen Verlauf der Erkrankung^{142,143}.

1.5 Wissenschaftliche Ansätze zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen

Bis zum heutigen Tag werden zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen unspezifisch wirkende Immunsuppressiva eingesetzt. Neben der positiven Wirkung auf die primär zu behandelnde Erkrankung führen diese Substanzen zumeist zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Reaktionsfähigkeit des Immunsystems gegenüber sekundären Infekten. Überdies ist eine erfolgreiche Therapie nur unter lebenslanger Gabe der zumeist sehr teuren

Medikamente zu erreichen, verbunden mit dem Auftreten von mitunter sehr starken Nebenwirkungen und führt zudem nicht zur Heilung der auslösenden immunologischen Erkrankung¹⁴⁴.

Daher wird seit vielen Jahren daran gearbeitet, neue Therapiekonzepte zu entwickeln, die eine auto- bzw. alloantigenspezifische Toleranz induzieren, unter Verzicht auf immunsuppressive Medikamente. Neben gentherapeutischen Ansätzen mit immunmodulierenden Molekülen wie z.B. IL-10¹⁴⁵, TGF- β ¹¹¹, CTLA-4^{146,147} und TRAIL^{148,149}, werden immer mehr Arbeiten publiziert, die die prominente Stellung des Fas/FasL-Signalweges in der Apoptoseinduktion klinisch nutzbar machen wollen.

Fas, ein 45 kDa Typ-I-Transmembranprotein der TNF-Rezeptor-Superfamilie, ist der Rezeptor für FasL¹⁵⁰. Fas wird im menschlichen Körper ubiquitär exprimiert, verstärkt jedoch auf aktivierten T- und B-Zellen, auf Thymozyten sowie in der Leber, dem Herz und der Niere¹⁵¹. Bei Bindung des FasL wird Fas extrazellulär trimerisiert und dadurch aktiviert¹⁵². Dies induziert die intrazelluläre, “*death domain*” (DD) vermittelte Anlagerung des “*Fas-associated death domain*” (FADD) Adaptormoleküls und die dadurch ermöglichte Bindung von Pro-Caspase-8 an zwei weitere DDs des FADD¹⁵³. Der somit entstandene “*death-inducing signalling complex*” (DISC) führt zur Spaltung der Pro-Caspase-8 in die aktive Caspase-8, die ihrerseits autoprotolytische sowohl Pro-Caspase-8, als auch andere Caspasen aktiviert. Diese Vorgänge resultieren final in der Caspase-3 vermittelten Spaltung des “*inhibitor of caspase-specific DNase*” (ICAD), was den Weg zur “*caspase-specific DNase*” (CAD) abhängigen Spaltung der intranukleären DNS ebnet¹⁵⁴.

Obwohl erste Versuche zur direkten *in vivo* Applikation von rekombinaten FasL oder aktivierenden α -Fas Antikörpern zu einer fulminanten Leberschädigung führten^{155,156}, gibt es neuerdings einige vielversprechende, zellbasierte Ansätze zur Induktion peripherer Toleranz gegenüber Auto- und Alloantigenen unter Anwendung des Fas/FasL-Systems.

1.5.1 Zellbasierte experimentelle Ansätze

Die Mehrzahl der heute unter Verwendung des Fas/FasL-Signalwegs angewandten immunmodulatorischen Konzepte basieren auf der Idee des „Dritten Signals“, das zur Killer-APC führt. Grundlage dieses Konzepts ist die Interaktion von T-Zellen mit professionellen APC. Kommt es beim Kontakt dieser beiden Immunzellen zur TCR-HLA Interaktion, so wird in den T-Zellen eine funktionelle Anergie induziert. Erst wenn zu diesem TCR-HLA Signal auch ein zweites, kostimulatorisches Signal übertragen wird, kommt es zur Aktivierung und

klonalen Expansion von T-Zellen. In den therapeutischen Ansätzen wird den T-Zellen ein zusätzliches FasL-Signal angeboten, was in aktivierten Fas exprimierenden T-Zellen zu einer antigenspezifischen Apoptoseinduktion führt. In den hierzu verwendeten APC wird FasL entweder über gentechnische Modifikationen oder durch exogene Beladung auf der Zelloberfläche überexprimiert (**Abbildung 1**).

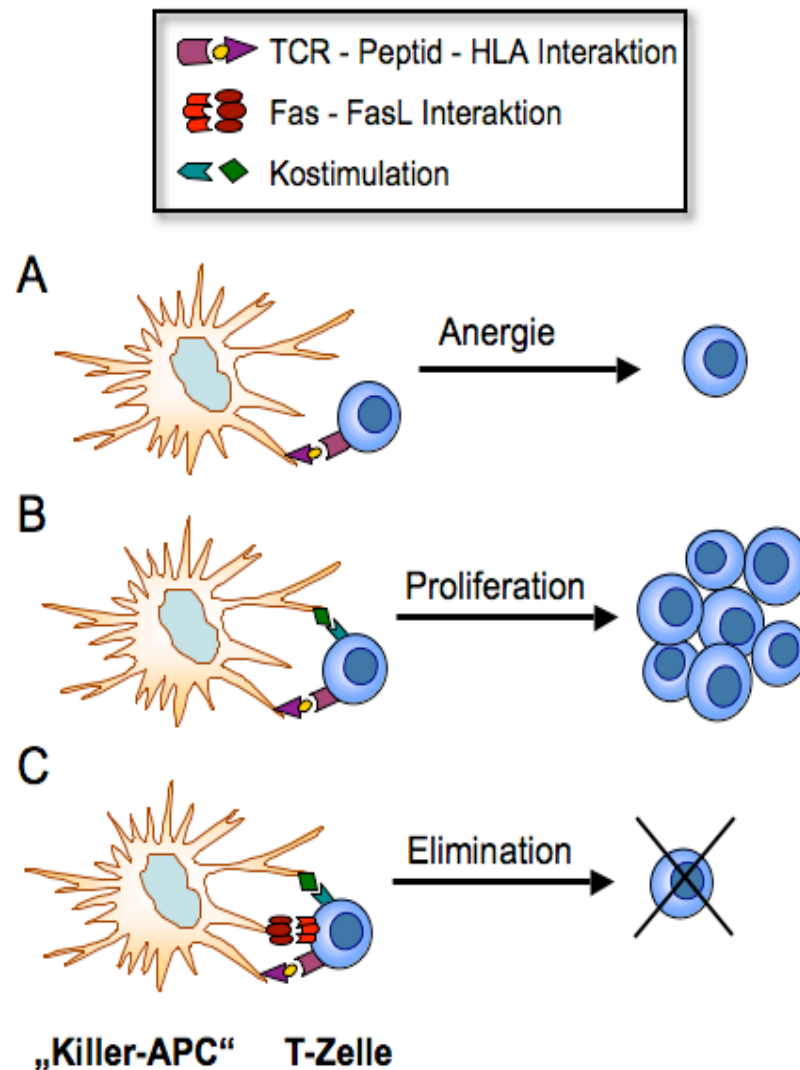


Abbildung 1: Konzept des „Dritten Signals“. Durch Antigenpräsentation (A) wird Anergie in T-Zellen induziert wohingegen es bei zusätzlicher Kostimulation (B) zur vollständigen Aktivierung und klonalen Expansion der T-Zellen kommt. FasL exprimierende „Killer-APC“ lösen in aktivierten T-Zellen Apoptose aus (C) und induzieren dadurch Toleranz gegenüber dem präsentierten Antigen.

Das Konzept, des „Dritten Signals“ wurde mittlerweile in den verschiedensten *in vivo* und *in vitro* Tiermodellen getestet. Dabei fanden B-Zelllinien¹⁵⁷, Makrophagen¹⁵⁸ und DC¹⁵⁹ als APC Verwendung. Zumeist exprimierten die verwendeten APC selbst Fas, was sie sensibler gegenüber Fas vermittelter Apoptose machte. Um diesen unerwünschten Nebeneffekt auszuschließen, verwendeten einige Arbeitsgruppen APC von Tieren, die Defekte im Fas/FasL-Signaltransduktionsweg aufwiesen¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Ebenso fanden Zelllinien Anwendung, die kein FasL exprimierten^{160,162-164}, oder deren Fas/FasL-Signalweg zuvor inaktiviert wurde^{157,165}.

Bis zum heutigen Tage wurden FasL-exprimierende-APC erfolgreich in den verschiedensten *in vivo* Modellen getestet. Darunter waren rheumatoide Arthritismodelle¹⁶⁶, allogene Transplantationsmodelle^{150,160,163,167}, Allergiemodelle¹⁶⁸ und Modelle zur Testung antigenspezifischer Immunreaktionen^{157,158,162,164,165}. Es konnte sogar gezeigt werden, dass FasL-exprimierende-APC T-Zellen, *in vivo* antigenspezifisch eliminieren¹⁶⁹.

Jedoch ist die Menge der Daten aus humanen *in vitro* Systemen begrenzt. Hoves et al. konnten zeigen, dass bei humanen, primären, reifen DC eine Überexpression von murinen FasL durch adenovirale Transduktion erzielt werden kann, die nicht in einer verstärkten Autoapoptose der FasL-exprimierenden-APC resultiert. Ebenso konnte belegt werden, dass diese FasL-exprimierenden-APC in humanen primären, aktivierten T-Zellen Apoptose induzieren können, wohingegen naive T-Zellen auf Grund ihrer fehlenden Fas-Expression nicht depletiert wurden¹⁷⁰⁻¹⁷². Andere Arbeitsgruppen untersuchten unter Verwendung verschiedener FasL transduzierter, humaner Zelllinien deren Potential zur peripheren Toleranzinduktion gegenüber Alloantigenen. Sowohl Dulat et al. als auch Strauss et al. konnten alloantigenspezifische T-Zellantworten unterdrücken^{173,174}. Dabei konnte die Immunantwort gegenüber viralen Antigenen aufrechterhalten werden¹⁷⁴. Jedoch konnte bis heute nicht der Beweis erbracht werden, dass humane FasL-exprimierende-APC humane T-Zellen antigenspezifisch eliminieren können.

Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse, die FasL-exprimierende-APC als eine hervorragende therapeutische Option zur Behandlung von Transplantatabstoßungsreaktionen^{163,167,169}, Autoimmunerkrankungen¹⁷⁵⁻¹⁸⁰ und chronischen Infektionen^{164,181} erscheinen lassen, gibt es viele Einschränkungen, die gegen eine klinische Anwendung dieser FasL-exprimierenden-APC sprechen. Für die Generierung von FasL exprimierenden APC ist die Transduktion des FasL Gens in die APC unbedingt erforderlich. Sowohl bei viralen, als auch bei nicht viralen Methoden ist die FasL Expression direkt proportional zur Effizienz der Transduktion. Deshalb müssten FasL-exprimierende-APC vor

einer möglichen therapeutischen Verwendung aufgereinigt werden, um eine Aktivierung von T-Zellen durch nicht transduzierte APC zu verhindern. Ebenso ist bekannt, dass FasL von der Zelloberfläche der APC durch Metalloproteinasen freigesetzt werden kann. Der so entstandene lösliche FasL kann an Fas auf den Zielzellen binden und so zur Blockade des Fas/FasL-Signalweges führen^{170,182}. Darüber hinaus ist die Generierung von APC sehr zeit-, arbeits- und kostenintensiv. Auch lässt sich eine gleich bleibend hohe Qualität der Zellen nicht von Spender zu Spender sicherstellen, was wiederum zu einem variierenden funktionellen Phänotyp der FasL-exprimierenden-APC führt. Auch sind viele der zu behandelnden Patienten schon zu Beginn einer möglichen Therapie immunsupprimiert, was die Menge des potentiell zur Verfügung stehenden Zellmaterials erheblich einschränkt. Ein weiterer limitierender Faktor ist die Tatsache, dass FasL-exprimierende-APC ebenso wie alle anderen Körperzellen sensitiv für die zytotoxischen Effektorfunktionen von CTL sind, was ihre Effizienz *in vivo* deutlich reduzieren könnte¹⁸³. Nicht zuletzt können FasL-exprimierende-APC durch die Präsentation von protektiven viralen und bakteriellen Antigenen ungewollt Toleranz gegenüber diesen potentiell gefährlichen Erregern induzieren.

1.5.2 Artifizielle experimentelle Ansätze

Die Entwicklung der Tetramertechnologie eröffnete viele neue Möglichkeiten immunmodulatorischer Ansätze¹⁸⁴. Nicht nur, dass seitdem antigenspezifische T-Zellen direkt visualisiert werden konnten, sondern auch die einzelnen Bausteine der Tetramere (MHC-monomere und -dimere) erlaubten die Untersuchung einer nicht zellabhängigen Interaktion von TCR und MHC¹⁸⁵. Schon früh konnte gezeigt werden, dass die Bindung von H-2k^b-Dimer Molekülen an alloreaktive H-2k^b spezifische T-Zellklone und primäre T-Zellen, schon bei nanomolekularen Konzentrationen, sehr stabil war und auch die zytotoxischen Effektorfunktionen dieser T-Zellen unterbanden¹⁸⁶. Einen weiteren Hinweis auf die inhibitorische Wirkung von MHC-Klasse-I-Tetrameren auf die zytotoxischen Eigenschaften von T-Zellen fand die Gruppe um Maile et al. Diese konnte bei wiederholter Injektion von HY-D^b-Tetramer in weibliche B6-Mäuse eine Transplantatabstoßung von männlichen B6 Hauttransplantaten unterbinden. Dabei vermuteten sie eine Anergieinduktion oder die Auslösung von aktivierungsinduziertem Zelltod (AICD) in den entsprechenden tetramerspezifischen T-Zellen. Somit konnte bereits demonstriert werden, dass MHC-Multimere ein großes Potential für die selektive Immuntherapie von Transplantatabstoßungsreaktionen haben¹⁸⁷.

Da peptidbeladene MHC-Moleküle eine hohe Affinität zu ihrem korrespondierenden TCR besitzen, können sie antigenspezifisch an T-Zellen binden. Diese Fähigkeit machten sich einige Arbeitsgruppen zu Nutze, um antigenspezifische T-Zellen antigenspezifisch zu depletieren. Yuan et al. demonstrierten, dass ^{225}Ac (Actinium 225) konjugierte MHC Tetramere, spezifisch für das Influenza Matrixprotein 1 (FluM1₅₈₋₆₆; GILGFVFTL) oder das humane EBV latente Membranprotein 1 (LMP1; YLLEMLWRL), peptidspezifische CD8⁺ T-Zelllinien binden konnten. In den spezifisch gebundenen CD8⁺ T-Zellen wurde dann durch die Emittierung von α -Teilchen Apoptose induziert, wobei unspezifische CD8⁺ T-Zellen weder durch das ^{225}Ac -MHC-Tetramer gebunden wurden, noch in ihnen Apoptose induziert wurde¹⁸⁸. Ein ähnlicher Ansatz zeigte, dass der an ein MHC-Tetramer konjugierte Ribosomeninhibitor Sapronin nach nur 72 h in den entsprechenden antigenspezifischen T-Zellen zu 75 % Apoptose induzierte. Dabei war die Effizienz dieses Konstrukts abhängig von der Menge des verwendeten MHC-Tetramers und der Affinität der antigenspezifischen T-Zellen. Kontroll-T-Zellen wurden nicht eliminiert¹⁸⁹.

Diese und andere Ergebnisse¹⁹⁰ zeigen, dass MHC-Tetramer basierte artifizielle Ansätze zur Modulation von Immunantworten in Autoimmunreaktionen und chronischen Infektionen eingesetzt werden können. Es wäre jedoch wünschenswert, eine Plattformtechnologie zu besitzen, die sich den entsprechenden Behandlungsbedürfnissen besser anpassen lässt. Neben dem MHC-TCR Signal könnten noch weitere Signale dargeboten werden. So könnte durch die zusätzliche Verwendung spezifischer Subpopulationsmarker die Spezifität der T-Zellerkennung erhöht werden. Ebenso könnte z.B. ein kostimulatorisches Signal besser reguliert, beeinflusst oder variiert und somit eine antiapoptotische Wirkung verhindert werden. Auch sind solche artifiziellen Systeme nicht anfällig gegenüber den zytotoxischen Effektorfunktionen der Ziel-CTL, was es erlauben würde, therapeutische Dosis-Wirkungs Verhältnisse besser, verlässlicher und spenderspezifischer bestimmen zu können.

Vielversprechende Ansätze zur Kombination verschiedener zellimmitierender Signale, die der Zielzelle auf einer artifiziellen Basis dargeboten werden, sind zur polyklonalen und antigenspezifischen Expansion von T-Zellen publiziert worden. Dabei galt das Augenmerk dieser Arbeiten der Generierung von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen zum Einsatz in adaptiven Immuntherapien¹⁹¹⁻²⁰⁴.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Behandlung von Patienten mit Transplantatabstoßungsreaktionen oder mit T-zellvermittelten Autoimmunerkrankungen beruht heute hauptsächlich noch auf der Verwendung unspezifisch wirkender Immunsuppressiva, die schwere Nebenwirkungen hervorrufen können. Wünschenswert hingegen wäre die gezielte Induktion einer antigenspezifischen Toleranz gegenüber den autoreaktiven und pathogenetisch relevanten T-Zellen ohne allgemeine Immunsuppression. Eines der innovativsten Konzepte beruht auf der Verwendung antigenpräsentierender Zellen (APC), die durch genetische Modifikationen oder exogene Beladung FasL exprimieren und somit zur antigenspezifischen Apoptoseinduktion in T-Zellen befähigt sind²⁰⁵. Das große Potential dieses Ansatzes konnte durch unsere und verschiedene andere Arbeitsgruppen *in vivo* und *in vitro* demonstriert werden. In fast allen dieser Publikationen konnte eine alloantigen- oder antigenspezifische Elimination von T-Zellen durch FasL-exprimierende-APC gezeigt werden^{158,159,161,164-166,170,171,174,177,182,206-209}. Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse sind zellbasierte Ansätze zur Fas/FasL vermittelten Induktion peripherer Toleranz wahrscheinlich in der Klinik nicht umsetzbar, aufgrund der damit verbundenen Arbeitsintensität, der erforderlichen Transduktionen, wechselnden Phänotypen und dem Problem, an ausreichendes und qualitativ hochwertiges Material von zumeist immunsupprimierten Patienten zu gelangen. Daher wird seit geraumer Zeit besonders zur Generierung und Expansion tumorspezifischer CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen auf so genannte artifizielle-APC (aAPC) zurückgegriffen¹⁹¹⁻²⁰⁴. Der Vorteil gegenüber den zellbasierten Ansätzen liegt in der kostengünstigen und standardisierten Herstellungsweise, welche einen konstanten Phänotyp mit stabiler Funktion der aAPC ermöglicht.

Vor diesem Hintergrund war es das Ziel dieser Arbeit, eine Killer-artifizielle-antigenpräsentierende Zelle (KaAPC) herzustellen, die die Vorzüge des Fas/FasL-Systems mit denen der aAPC kombinieren sollte. Hierzu sollte, basierend auf den Arbeiten von Oelke et al.^{194,210} zu aAPCs, HLA-A₂-Ig Dimer zusammen mit einem α -Fas Antikörper auf der Oberfläche eines paramagnetischen „beads“ immobilisiert werden.

Anschließend sollte ein funktioneller, zur antigenspezifischen Elimination von humanen CD8⁺ T-Zellen befähigter Phänotyp einer solchen KaAPC identifiziert und ausführlich, unter Verwendung der beiden humanen Modellantigene Mart-1 und CMV_{pp65}, charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Medien, Puffer und Lösungen

Alle Medien, Puffer und Lösungen wurden, sofern sie nicht steril erworben wurden, vor deren Verwendung über einen 0,22 µm Fliter (Millipore, Schwalbach) sterilfiltriert.

AB-Serum, human:	PAN Biotech, Aidenbach
Annexinbindepuffer:	10 ml 1M HEPES; 8,12 g NaCl (Merck, Darmsatdt); 0,12 g CaCl ₂ (Merck, Darmstadt); add 1000 ml H ₂ O _{bidest}
„bead“-Waschpuffer:	0.001 % NaN ₃ (250 µl, 10 % ig, Sigma, München); 2 mM EDTA (1 ml, 0.5 M); 0.1 % BSA (0.25 g) + 250 ml PBS
Boratpuffer:	1,55 g H ₃ BO ₃ (Merck, Darmstadt) + 250 ml H ₂ O _{bidest} ; pH 7.0-7.4
BSA (<u>B</u>ovine <u>s</u>erum <u>a</u>lbumin):	PAA, Linz
Diluent C:	Sigma, München
DMSO (<u>D</u>imethylsulfoxid):	Sigma, München
Einfriermedium:	50 % RPMI _{minus} + 40 % FKS + 10 % DMSO
EDTA (<u>E</u>thylendiamintetraacetat):	(Merck, Darmstadt)
FACSClean:	Beckman Coulter, Krefeld
FACSflow:	Beckman Coulter, Krefeld
FACSRinse:	Beckman Coulter, Krefeld
FACS-Fixaktiv:	PBS + 1 % Paraformaldehyd (Sigma, München)
FACS-Waschpuffer:	PBS + 10 % FKS + 1 % NaN ₃ (Sigma, München)
FKS (<u>F</u>ötales <u>K</u>älberserum):	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Hanks`balanced salt solution:	PAA, Linz
HEPES:	Sigma, München
Lymphocytenseparationslösung (Ficoll):	PAA, Linz
MACS-Puffer:	PBS + 2 mM EDTA (Sigma, München) + 0,5 % humanes AB-Serum, pH 7,4
PBS (<u>P</u>hosphate <u>b</u>uffered <u>s</u>aline):	(PAN, Aidenbach)

RPMI_{minus}:	500 ml RPMI 1640 ohne L-Glutamin (Bio Whittaker) mit folgenden Zusätzen: 5 ml 200 mM L-Glutamin (100x, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe); 5 ml Natriumpyruvat 100 mM (100x, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe); 5 ml nicht essentielle Aminosäuren (100x, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe); 5 ml 10 mg/ml Penicillin/Streptomycin (PAA, Linz); 2 ml MEM Vitamine (100x, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe); 1 ml β -Mercaptoethanol (0,2% in PBS, Amersco)
T-Zell-Kokulturmedium:	RPMI _{minus} + TCGF + 3% humanes AB-Serum
T-Zell-Medium:	RPMI _{minus} + 10% humanes AB-Serum
T-Zell-Stimulationsmedium:	RPMI _{minus} + TCGF + 10% humanes AB-Serum
TCGF:	konditionierter Zellüberstand (2.2.1.3)

2.1.2 Farbstoffe

Farbstoff	Konjugation	Hersteller
7-AAD	-	Pharmingen/BD, Heidelberg
AnnexinV	PE	Caltag, Hamburg
AnnexinV	APC	Caltag, Hamburg
PKH26	-	Sigma, München
PKH67	-	Sigma, München
Propidiumiodid	-	Pharmingen/BD, Heidelberg

2.1.3 HLA-A₂ restringierte Peptide

Peptid	Aminosäuresequenz	Lösung	Hersteller
Mart-1	ELAGIGILTV	Standardmedium 10-20 % DMSO	Bachem, Weil am Rhein
CMV _{pp65}	NLVPMVATV	Standardmedium 10-20 % DMSO	Bachem, Weil am Rhein

2.1.4 Peptid HLA-A*0201 Tetramere

Tetramer	Konjugation	Hersteller
Mart-1	PE	Beckman Coulter, Krefeld
CMV _{pp65}	PE	Beckman Coulter, Krefeld

2.1.5 Antikörper und dimere Moleküle

Für den Nachweis von Oberflächenmarker, oder auf „beads“ konjugierten Moleküle wurden folgende direkt konjugierte, monoklonalen Antikörper verwendet:

Spezifität	Isotyp	Klon	Herkunft	Konjugation	Hersteller
primäre AK					
CD3	IgG1	UCHT1	Maus	PEc5	Immunotech, Marseilles
CD3	IgG1	UCHT1	Maus	ECD	Immunotech, Marseilles
CD4	IgG1	13B8.2	Maus	PEc5	Immunotech, Marseilles
CD4	IgG1	SFC112T4D11	Maus	ECD	Immunotech, Marseilles
CD8	IgG2a	UHCT-4	Maus	FITC	Sigma, München
CD8	IgG1	SFC121Thy2D3	Maus	PE-Cy5	Immunotech, Marseilles
CD8	IgG1	SFC121Thy2D3	Maus	ECD	Immunotech, Marseilles
CD107a	IgG1	H4A3	Maus	Per-Cy5	BD, Heidelberg
sek. AK					
Maus-IgG1	IgG1	A85-1	Rat	PE	BD, Heidelberg
Maus-IgG2a	IgG1	R19-15	Rat	FITC	BD, Heidelberg
Maus-IgM	IgG2a	R6-60.2	Rat	FITC	BD, Heidelberg
Isotypkont.					
	IgG1	MOPC-21	Maus	FITC, PE	BD, Heidelberg
TNP	IgG2a	G155-178	Maus	FITC	BD, Heidelberg
	IgM	GC323	Maus	PE	Immunotech, Marseilles

Folgende monoklonalen Antikörper wurden zur *in vitro* Stimulation verwendet:

Spezifität	Isotyp	Klon	Herkunft	Konjugation	Hersteller
Fas	IgM	CH11	Maus		Upstate, Chicago, IL
TNP	IgM	G155-228	Maus		BD, Heidelberg
TNF- α	IgG1	MP9-20A4	Rat		Serotec, Düsseldorf
	IgG1		Rat		Serotec, Düsseldorf

Zur Generierung von aAPC und KaAPC wurden folgende monoklonale Antikörper und dimere Moleküle auf M-450 Epoxybeads (Dyna/Invitrogen, Oslo) konjugiert:

Spezifität	Isotyp	Klon	Herkunft	Konjugation	Hersteller
CD28	IgG2a	clone9.3	Maus		J.P. Schneck MD, Ph.D.
Fas	IgM	CH11	Maus		Upstate, Chicago, IL
HLA-A ₂ -Dimer	IgG1		Mensch/ Maus		J.P. Schneck MD, Ph.D.

2.1.6 „beads“

Name	Hersteller
CD8 ⁺ T cell Isolation Kit	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
α -CD3/CD28 Dynabeads (T Cell Expander)	Dynal/Invitrogen Oslo
M-450 Epoxybeads	Dynal/Invitrogen Oslo

2.1.7 Zellkulturflaschen, -platten, -röhrchen

25 cm ² Kulturflaschen	Corning/Costar, NY
75 cm ² Kulturflaschen	Corning/Costar, NY
175 cm ² Kulturflaschen	Corning/Costar, NY
96-well Rundbodenplatten	Nunc, Langenselbold
24-well Platten	Falcon/BD, Franklin Lakes
12-well Platten	Falcon/BD, Franklin Lakes
6-well Platten	Falcon/BD, Franklin Lakes
15 ml Zentrifugationsröhrchen	Falcon/BD, Franklin Lakes
50 ml Zentrifugationsröhrchen	Falcon/BD, Franklin Lakes
200 ml Zentrifugationsröhrchen	Falcon/BD, Franklin Lakes
14 ml Polystyrene Röhrchen	Falcon/BD, Franklin Lakes
FACS-Röhrchen unsteril	Falcon/BD, Franklin Lakes
FACS-Röhrchen steril	Falcon/BD, Franklin Lakes
Einfrier-Röhrchen	Nalgene Nunc, International Hereford
0,22 μ m SpinX-Röhrchen	Corning/Costar, NY
1,5 ml Cups	Sarstedt, Nürnbrecht
2 ml Pipetten	Corning/Costar, NY
5 ml Pipetten	Corning/Costar, NY
10 ml Pipetten	Corning/Costar, NY
25 ml Pipetten	Corning/Costar, NY
50 ml Pipetten	Corning/Costar, NY
Glasröhrchen klein (12 x 35 mm)	Fisher Scientific, Schwerte
Glasröhrchen groß (4ml)	VWR, Darmstadt

2.1.8 Software und Internetportale

Microsoft Office (Microsoft Corporation, Unterschleißheim)

Sigma Plot (Systat Software Inc., Erkrath)

WinMDI2.8 (<http://facs.scripps.edu/software.html>)

FACSExpress 3 (De Novo Software, Thornhill, ON)

FlowJo (Tree Star, Ashland, USA)

The National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Methoden

Alle Arbeiten mit humanen primären Zellen und den funktionellen „beads“ wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt (HERAsafe KS18, ThermoFisher Scientific).

2.2.1.1 Primärzellen

Alle verwendeten humanen primären Zellen wurden aus Blut gesunder, freiwilliger Spender gewonnen. Diese waren zuvor über mögliche Risiken aufgeklärt worden und hatten ihre Einwilligung gegeben.

2.2.1.1.1 Kultivierung von Zellen

Soweit nicht anders angegeben, wurden die primären Zellen in einem Zellkulturschrank (CO₂-Inkubator CD210, Binder) bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %, einem CO₂-Gehalt von 5 % und bei einer Temperatur von 37 °C kultiviert. Die Generierung von antigenspezifischen humanen CD8⁺ CTL und alle funktionellen Analysen mit diesen Zellen wurden unter diesen Bedingungen durchgeführt.

2.2.1.1.2 Zentrifugation von Zellen

Die Zentrifugationen der Primärzellen wurden bei 300x g für 10 min bei RT durchgeführt (Omnifuge 2.0RS oder Tischzentrifuge Biofuge fresco, beide Heraeus Sepatech, Kendro). Abweichungen davon sind bei den jeweiligen Methoden angegeben.

2.2.1.1.3 Zellzahlbestimmung

Zur Ermittlung der Zellzahl wurden Zellen in einer Lösung aus 0,4 % Trypanblau (Sigma, München) und 0,9 % NaCl (Merck, Darmstadt) verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer mit Hilfe eines Mikroskops (Axiovert 25, Zeiss) ausgezählt. Diese Methode erlaubt die Unterscheidung von lebenden und toten Zellen, da nur abgestorbene Zellen eine Blaufärbung aufgrund fehlender Membranintegrität aufweisen. Die Zellzahl pro ml wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der lebenden Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Großquadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10000 = \text{Zellzahl/ml}$$

Die angegebenen Zellzahlen beziehen sich jeweils auf die Anzahl lebender Zellen.

2.2.1.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Die Zellen wurden gezählt, in PBS gewaschen und in 1 ml gekühltem Einfriermedium aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension in Einfrier-Röhrchen (Nalgene Nunc, International Hereford) abgefüllt, wobei eine Zellzahl von 100×10^6 Zellen/Einfrier-Röhrchen nicht überschritten wurde. Die befüllten Einfrier-Röhrchen wurden dann ü.N. bei -80 °C in einer Styroporkiste gelagert. Dies ermöglichte das langsame Abkühlen der Zellsuspension. Danach wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff überführt und bei -180°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.1.1.5 Auftauen von Zellen

Die tiefgekühlten Zellen wurden im 37 °C Wasserbad auf 0 ° C erwärmt. Danach wurden diese Zellen schrittweise in ein auf 37 °C vorgewärmtes und mit 20 ml PBS befülltes 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Dieses Protokoll gewährleistet ein zügiges und schonendes Auftauen der Zellen. Im Anschluss daran wurden die Zellen sofort zentrifugiert und in frischem Medium aufgenommen.

2.2.1.2 „beads“

2.2.1.2.1 Generierung von KaAPC und Kontrollbeads (c.b.)

Die Herstellung von KaAPC respektive Kontrollbeads erfolgte über einen Zeitraum von drei Tagen. Währenddessen wurden die einzelnen Ansätze auf einem Rotator (MACSmixTM, Miltenyi, Bergisch-Gladbach) bei 4 – 8 °C ü.N. inkubiert.

Tag 1: 100×10^6 M-450 Epoxybeads (Dyna/ Invitrogen, Oslo) (250 µl; 400×10^6 / ml) wurden in ein frisches großes Glasröhrchen überführt und mindestens 250 µl Boratpuffer hinzugegeben. Das Glasröhrchen wurde dann für mindesten 2 min auf einen Magneten gespannt und der Überstand sauber abgenommen. Die anschließende Resuspension der M-450 Epoxybeads erfolgte anschließend in den entsprechenden Beladungsansätzen. Mit Parafilm verschlossen wurden die Glasröhrchen dann bei 4 – 8 °C ü.N. inkubiert.

Beladungsansätze: Falls in den einzelnen Versuchen nicht anders angegeben, wurden folgende Mengen an HLA-A₂-Ig Dimer und α-Fas Antikörper, in einem Volumen von 550 µl Boratpuffer, zur Herstellung von funktionellen „beads“ verwendet.

Kontrollbeads (c.b.) - 0.01 µg HLA-A₂-Ig Dimer

- add. 550 µl Boratpuffer

KaAPC - 0.01 µg HLA-A₂-Ig Dimer

- 2 µg α-Fas Antikörper (CH11)

- add. 550 µl Boratpuffer

Während der Beladung der M-450 Epoxybeads in Boratpuffer kam es zum Aufschluss, der sich auf der „bead“-Oberfläche befindlichen Epoxygruppen. Dies führte ü.N. zur kovalenten, N-terminalen Bindung des HLA-A₂-Ig Dimers bzw. des α-Fas Antikörpers. Jedoch konnte durch diese Methode keine gerichtete Bindung des HLA-A₂-Ig Dimers und der α-Fas Antikörper sichergestellt werden.

Tag 2: Die großen Glasröhrchen wurden in 50 ml Zentrifugationsröhrchen (BD, Heidelberg) gestellt und bei 3000x g für 2 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Parafilm entfernt und die Glasröhrchen mit den „beads“ für mindestens 2 min auf einen Magneten gespannt. Nach Abnahme des Überstandes wurden die einzelnen Ansätze mit je 1 ml „bead“-Waschpuffer 3x gewaschen. Dabei wurden die „beads“ zwischen den Waschschritten jeweils aus dem angelegten Magnetfeld entfernt und gut resuspendiert. Abschließend wurde 1 ml „bead“-Waschpuffer auf jeden Ansatz gegeben, die „beads“ resuspendiert, die Glasröhrchen mit Parafilm abgedichtet und bei 4 – 8 °C ü.N. gelagert. Hierbei kam es zum Entfernen ungebundenen HLA-A₂-Ig Dimers und α-Fas Antikörpers und führte ü.N. zum Absättigen der noch freien Epoxygruppen.

Tag 3: Die großen Glasröhrchen wurden in 50 ml Zentrifugationsröhrchen (BD, Heidelberg) gestellt und bei 3000x g für 2 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Parafilm entfernt und die Glasröhrchen mit den „beads“ für mindestens 2 min auf einen Magneten gespannt. Nach Abnahme des Überstandes wurden die einzelnen Ansätze mit je 1 ml PBS (PAN, Aidenbach) resuspendiert. Aus diesen Ansätzen wurden dann Aliquots in kleine Glasröhrchen überführt und entsprechend beladen (2.2.1.2.4).

2.2.1.2.2 Generierung von aAPC

aAPC wurden nach demselben Protokoll wie die KaAPC und Kontrollbeads generiert (2.2.1.2.1), jedoch unterschieden sie sich in der „bead“-Menge (400×10^6) pro Beladungsansatz und in der Zusammensetzung des Beladungsansatzes (20 µg HLA-A₂-Ig Dimer und 20 µg α-CD28 Antikörper in 1 ml Boratpuffer). Ebenso wurden für die Beladung nicht nur HLA-A₂-Ig Dimer, sondern auch ein α-CD28 Antikörper (Klon 9.3), als kostimulatorisches Signal verwendet. Nach der Beladung konnten 0.9×10^5 Moleküle HLA-A₂-Ig Dimer und 1.9×10^5 Moleküle des α-CD28 Antikörpers je „bead“ nachgewiesen werden²¹⁰. aAPC wurden im Gegensatz zu den KaAPC und Kontrollbeads mit 30 µg/ ml Peptide beladen und nach der Beladung (2.2.1.2.5) direkt zur Generierung von antigenspezifischen CD8⁺ CTL eingesetzt¹⁹⁴.

2.2.1.2.3 Einstellen der „bead“-Konzentration

Zur Ermittlung der „bead“-Zahl wurden „beads“ in PBS (PAN, Aidenbach) seriell verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer mit Hilfe eines Mikroskops (Axiovert 25, Zeiss) ausgezählt. Dieser Vorgang wurde wegen der raschen Sedimentationszeit der Beads und deren bevorzugtem Haften an der Pipettenspitzenaußenseite dreimal wiederholt und die erhaltenen Werte gemittelt. Die „bead“-Zahl pro ml wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{gemittelte „bead“-Zahl}}{\text{Anzahl der ausgezählten Großquadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10000 = \text{„bead“-Zahl/ml}$$

Alle verwendeten „beads“ wurden, wenn nicht anders angegeben, auf eine Konzentration von 1×10^7 „beads“/ ml in PBS (PAN, Aidenbach) eingestellt.

2.2.1.2.4 Lagerung der funktionellen „beads“

Die auf eine Konzentration von 1×10^7 „beads“/ ml in PBS (PAN, Aidenbach) eingestellten funktionellen „beads“ wurden in großen Glasröhrchen (VWR, Darmstadt) bei 4 – 8 °C gelagert. Die gelagerte Gesamtmenge pro Ansatz überstieg in den meisten Fällen nicht die Menge von 10×10^7 „beads“. Der funktionelle Phänotyp blieb bei dieser Art der Lagerung bis zu 12 Monaten erhalten.

2.2.1.2.5 Beladung der funktionellen „beads“

Zur Beladung der funktionellen „beads“ wurden ca. 20×10^6 in ein neues, kleines Glasröhrchen überführt und der Überstand mittels eines Magneten (Dynal/Invitrogen, Oslo) und einer Pasteurpipette entfernt. Anschließend wurde das Glasröhrchen vom Magneten entfernt und die „beads“ in 500 µl frischem PBS (PAN, Aidenbach) resuspendiert und 5 µg des gewünschten Peptids (Mart-1, CMV_{pp65}, FluM1, EBV) dazugegeben. Die Beladung erfolgte ü.N. bei 4 – 8 °C.

Am folgenden Tag wurde ein Aliquot der beladenen „beads“ in ein neues, kleines Glasröhrchen transferiert und der Überstand, wie am Vortag, entfernt. Falls nicht anders angegeben, wurden die „beads“ vor jeder Verwendung in einem funktionellen Assay

gewaschen. Hierzu wurde jeweils 1 ml frisches PBS (PAN, Aidenbach) zum resuspendieren der „beads“ genutzt, wobei das kleine Glasröhrchen währenddessen vom Magneten entfernt wurde. Nach einer anschließenden Inkubation des Glasröhrchens für mindestens 2 min auf einem Magneten, wurde der Überstand erneut mittels einer Pasteurpittete abgesaugt. Dieser Waschschritt wurde sechsmal wiederholt. Abschließend wurden die „beads“ in 1 ml PBS (PAN, Aidenbach) aufgenommen, die Konzentration auf 1×10^7 „beads“/ ml eingestellt und diese dann bis zur weiteren Verwendung bei 4 – 8 °C gelagert.

2.2.1.3 Herstellung des TCGF

Aus dem Leukapheresat eines oder mehrerer gesunder Spender wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation die MNC isoliert. Zur Herstellung eines Liters TCGF wurden je 2×10^9 MNC in sechs 175 cm² Kulturflaschen aufgeteilt. In jede dieser 175 cm² Kulturflaschen wurden dann 3 ml einer zuvor bestrahlten LAZ 388 Suspension gegeben (4×10^8 LAZ 388, 60 Gy, in 18 ml RPMI_{minus} + 3 % humanes AB-Serum). Ebenso wurden je 175 cm² Kulturflaschen 3 ml Stimulationsmedium hinzugegeben (5 µg PMA + 4 mg PHA in 18 ml RPMI_{minus} + 3 % humanes AB-Serum). Die 175 cm² Kulturflaschen wurden dann mit RPMI_{minus} + 3 % humanem AB-Serum auf 170 ml je Kulturflasche aufgefüllt und für 3 h inkubiert. Nach Ablauf der 3 h wurde kontrolliert, ob die Zellen am Boden der Kulturflaschen adhärirt waren und daraufhin der 170 ml Überstand vorsichtig abgenommen. Jede Kulturflasche wurde anschließend 3x mit je 30 ml RPMI_{minus} + 3 % humanem AB-Serum gewaschen und erneut mit 170 ml frischen RPMI_{minus} + 3 % humanem AB-Serum aufgefüllt. Es folgte eine erneute Inkubation von ca. 36 h. Der so konditionierte Überstand wurde abgenommen und bei 300x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand sterilfiltriert und in 40 ml Aliquots weggefrohren. Die Aktivität jedes neuen TCGFs wurde vor dessen Verwendung mittels MTT-assay oder ³H-Thymidin-Proliferationsassay getestet und an die relative Aktivität des zuvor verwendeten TCGF angeglichen. Die Analyse von verschiedenen TCGF ergab folgende Zytokinzusammensetzung: IFN-γ⁺, TNF-α⁻, IL-1β⁻, IL-2⁺, IL-4⁺, IL-5^{low}, IL-6⁺, IL-7^{low}, IL-8⁺, IL-10⁺, IL-12p70⁻.

2.2.2 Primärzellgewinnung und -bearbeitung

2.2.2.1 MNC-Gewinnung aus Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation

Mononukleäre Zellen aus dem Blut (MNC) wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus heparinisiertem Vollblut (Heparin-Endkonzentration: 25 IU/ml) gesunder Spender (verschiedene HLA-A₂⁺ männliche und weibliche Spender) gewonnen. Hierfür wurde in speziellen 50 ml Röhrchen (BD, Heidelberg) 20 ml Lymphozytenseparationslösung vorgelegt. Das heparinisierte Vollblut bzw. das Leukapheresat (2.2.2.2) wurde anschließend mit PBS 1 : 1 verdünnt und auf Lymphozytenseparationslösung aufgetragen. Nach 20 minütiger Zentrifugation (1900 rpm /4 °C) hatte sich das Vollblut bzw. das Leukapheresat (2.2.2.2) in eine schwere Fraktion (Erythrozyten), eine Interphase (MNC) und den Überstand (Thrombozyten) getrennt. Die Interphase wurde mit einer Pipette abgesammelt und zweimal mit 30 - 50 ml PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen gezählt und entweder eingefroren oder zur Gewinnung von CD8⁺ CTL weiter verwendet.

2.2.2.2 T-Zell-Gewinnung mittels Gegenstromisolation

Von gesunden Spendern (verschiedene HLA-A₂⁺ männliche und weibliche Spender) wurden durch Leukapherese (Blutzellseparator CS 3000 plus, Baxter) mononukleäre Zellen (MNC) gewonnen. Dabei wurde das Blut in eine erythrozytenreiche Fraktion, die dem Spender zurückgegeben wurde, sowie eine erythrozytenarme Fraktion aufgetrennt. Aus letzterer wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation die MNC gewonnen (2.2.2.1). Diese Zellen wurden mit einer Spezialkammer in einer J6-MC Zentrifuge (Beckman) einer Elutriation unterzogen. Es handelte sich dabei um eine Gegenstromzentrifugation, bei der die verschiedenen MNC gemäß ihrer Größe und Dichte aufgetrennt und fraktioniert gesammelt werden konnten. Zunächst wurde das System über eine Peristaltikpumpe mit einer 6 %-igen H₂O₂-Lösung (in H₂O) für 20 min sterilisiert, anschließend mit PBS (PAN, Aidenbach) gespült und die Pumpe mit Hanks'-Lösung (PAA, Linz) geeicht. Dazu wurde mit 2500 rpm bei 4 °C das geförderte Volumen pro Zeiteinheit in eine Eichgerade gegen die jeweilige Pumpeneinstellung aufgetragen. Nach diesen Vorbereitungen konnte das System bei einer Durchflussrate von 52 ml/min mit den MNC aus der Leukapherese in Hanks'-Lösung plus 6 % spenderautologem Plasma beschickt werden. Bei einer konstanten Umdrehungszahl der Zentrifuge von 2500 rpm wurden die einzelnen Zellfraktionen durch die Erhöhung der

Durchflussrate aufgetrennt und gesammelt. Fraktionen mit besonders hohem T-Zellanteil wurden bei einer Durchflussrate von 64 ml/min erhalten. Diese Fraktion enthält einen Anteil von 80 - 90 % $CD3^+$ Zellen, was durchflusszytometrisch durch Färbung mit einem α - $CD3$ -Antikörper kontrolliert wurde. Die T-Zellen wurden anschließend zentrifugiert, in T-Zell-Medium aufgenommen und gezählt. Aus den so gewonnenen T-Zellen wurden entweder die $CD8^+$ CTL mittels magnetischer Separation gewonnen oder sie wurden bis zur weiteren Verwendung kryokonserviert.

2.2.2.3 Magnetische Separation zur Gewinnung von humanen, naiven $CD8^+$ CTL

Diese Zellanreicherungsmethode (human $CD8^+$ Isolation Kit II, Miltenyi, Bergisch-Gladbach) beruht auf der Bindung von antikörperbeschichteten Eisenpartikeln an die Zelle. Im ersten Schritt werden die Eisenpartikel an die Zellen gebunden. Im zweiten Schritt wird die Zellsuspension an einem Magneten vorbeigeführt und separiert. Dabei gibt es positive Anreicherungsmethoden, in welchen die Eisenpartikel an die gewünschte Subpopulation gebunden werden, und negative Anreicherungsmethoden, in denen die zu depletierenden Zellpopulationen mit Eisenpartikeln markiert werden.

Für die Gewinnung von $CD8^+$ CTL aus einer T-Zellfraktion bzw. MNC wurden die Zellen in einem Zwei-Schritt-Färbeverfahren markiert. Im ersten Färbeschritt wurde die Zellen in 40 μ l/ 1×10^7 Zellen MACS-Puffer resuspendiert und dann für 10 min auf 4 - 8 °C mit 10 μ l/ 10^7 Zellen Haptenantikörper (mAK Maus anti-X) gefärbt. Im zweiten Färbeschritt wurde der Zellansatz aus dem ersten Färbeschritt mit je 30 μ l/ 10^7 Zellen MACS-Puffer verdünnt und zusätzlich 20 μ l/ 1×10^7 Zellen anti-Haptenantikörper-Eisenpartikel (mAK anti-Maus-Isotyp) dazugegeben. Nach der Färbung für 15 min auf 4 - 8 °C erfolgte ein Waschriss mit MACS-Puffer (20x Vol.) und die Resuspension der Zellen in 500 μ l/ 1×10^8 Zellen.

Da die verwendeten Eisenpartikel lediglich einen Durchmesser von 50 nm aufweisen, muss die Zellsuspension über eine Säule laufen, welche dicht mit paramagnetischen Eisenpartikeln gepackt ist. Für die Aufreinigung der Zellen wurden LS- und MS-Säulen (Miltenyi, Bergisch-Gladbach) verwendet, die in einen Permanentmagneten eingespannt wurden. Vor dem Säulenlauf wurden die Säule mit MACS-Puffer gewaschen (LS 3 ml, MS 500 μ l). Während des Säulenlaufs wurden die Eisenpartikel-markierten Zellen in der Säule zurückgehalten, wohingegen die nicht markierten Zellen die Säule im Eluat verließen. Nach Zentrifugation des Eluats und erneuter Resuspension der Zellen in MACS-Puffer, wurden diese auf eine weitere

Säule aufgetragen, um durch wiederholte Anreicherung die Reinheit der $CD8^+$ CTL zu erhöhen.

Im Anschluss an die Aufreinigung wurden die angereicherten Zellen mit einer FACS-Färbung auf ihre Reinheit untersucht. Die Zellpopulationen bestanden zu $\geq 90\%$ aus $CD3^+/CD8^+$ T-Zellen (**Abbildung 2**).

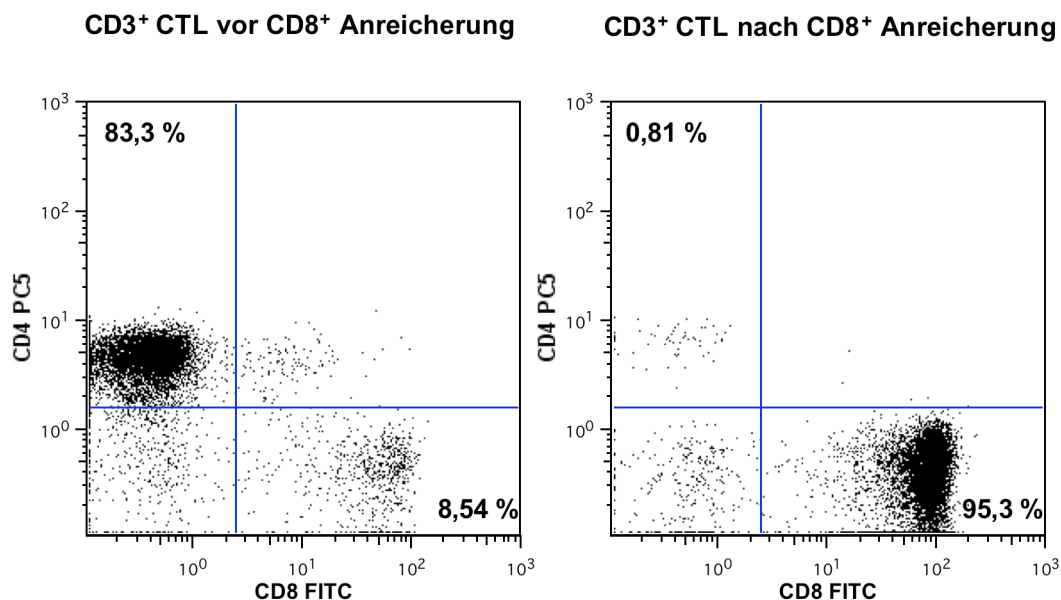


Abbildung 2: Reinheit der sortierten humanen $CD8^+$ CTL. Sowohl vor der $CD8^+$ Anreicherung als auch unmittelbar danach wurden die T-Zellen einer MNC Fraktion mit FITC-konjugierten α -CD8, PC5-konjugierten α -CD4 und ECD-konjugierten α -CD3 Antikörpern gefärbt. Dargestellt ist die Häufigkeit von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen bezogen auf lebende $CD3^+$ Zellen.

2.2.2.4 Generierung von humanen, antigenspezifischen $CD8^+$ CTL

Naive $CD8^+$ CTL wurden aus MNC durch magnetische Negativselektion nach dem Miltenyi-System angereichert. Die angereicherte Population bestand aus $>90\%$ $CD8^+$ T Zellen. Zur Generierung von antigenspezifischen $CD8^+$ CTL wurden 1×10^6 $CD8^+$ CTL mit 1×10^6 peptidbeladenen aAPC auf einer 96-well Rundbodenplatte kultiviert. Als Medium wurden 160 μ l T-Zell-Stimulationsmedium verwandt und alle 3 – 4 Tage 80 μ l des alten Mediums abgenommen und durch 80 μ l neues T-Zell-Stimulationsmedium ersetzt. Die $CD8^+$ CTL wurden wöchentlich, unter gleichen Bedingungen, mit peptidbeladenen aAPC restimuliert, wobei die alten aAPC, mittels eines MPC-1 Magneten (Dyna/Invitrogen, Oslo), zuvor entfernt wurden. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden die $CD8^+$ CTL sowohl am Ansatztag als auch bei jeder Restimulation auf Reinheit und Antigenspezifität untersucht. Ab

einer Antigen-spezifität von $\geq 50\%$ wurden die $CD8^+$ CTL Kulturen für die jeweiligen funktionellen Assays verwendet (**Abbildung 3**).

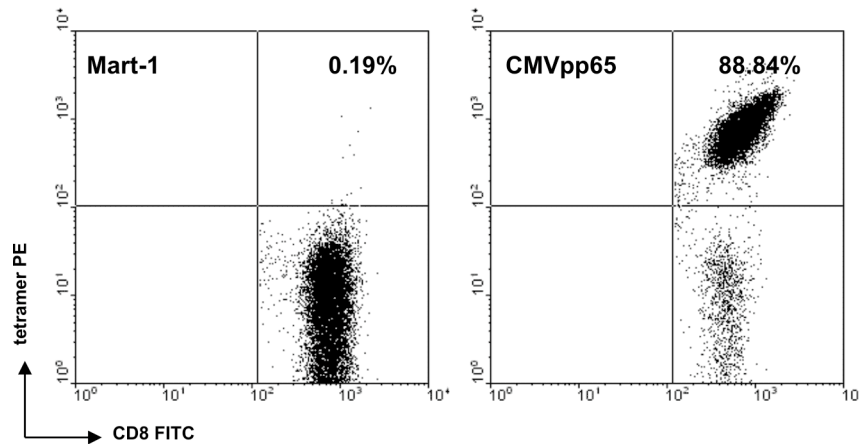


Abbildung 3: Antigen-spezifische $CD8^+$ CTL zur Durchführung von funktionellen Assays. Die hier exemplarisch dargestellten CMV_{pp65} spezifischen $CD8^+$ CTL wurden mittels wiederholter CMV_{pp65} aAPC Stimulation generiert. Zellen ähnlicher Spezifität für die unterschiedlichen Peptide wurden für die Durchführung der funktionellen Assays verwendet. Zur Feststellung der Spezifität wurde mit CMV_{pp65} -HLA-A*0201-Tetramer gefärbt. Die Färbung mit Mart-1-HLA-A*0201-Tetramer diente zur Kontrolle.

2.2.3 Funktionelle Analysen

2.2.3.1 Kokulturrexperimente

2.2.3.1.1 Kokultur von humanen, primären CTL mit funktionellen „beads“

Zur Untersuchung der funktionellen Eigenschaften der KaAPC und Kontrollbeads (c.b.) wurden Kokulturrexperimente mit humanen, antigen-spezifischen $CD8^+$ CTL angesetzt. Hierzu wurden $1,5 \times 10^5$ antigen-spezifische $CD8^+$ CTL/ well auf eine 96-well Rundbodenplatte ausgebracht und mit KaAPC oder c.b. stimuliert. Die funktionellen „beads“ waren zuvor mit unterschiedlichen Peptiden beladen worden (in den einzelnen Versuchen angegeben, durch die, dem „bead“-Namen vorangestellten, hochgestellten Peptidbezeichnungen), oder wurden auch unbeladen eingesetzt. Falls nicht anders angegeben wurden $CD8^+$ CTL und funktionelle „beads“ immer im Verhältnis 1 : 1 eingesetzt. $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ löslicher α -Fas Antikörper (Upstate, Chicago, IL) diente als Positivkontrolle, wohingegen unbehandelte antigen-spezifische $CD8^+$ CTL als Negativkontrolle fungierten. Die Stimulation der antigen-spezifischen $CD8^+$ CTL erfolgte für 48 h in $200 \mu\text{l}$ T-Zell-KokulturmEDIUM, falls nicht anders angegeben.

2.2.3.1.2 Zytokinassay

Von den, wie unter 2.2.3.1.1 beschriebenen Ansätzen wurden die Zellen nach Beendigung der Inkubationszeit abzentrifugiert (300x g, 10 min) und die Überstände bis zur weiteren Verwendung in ERG bei -20 °C gelagert.

Die Zytokinbestimmung erfolgte dann mit dem Luminex® 100 IS™ System (Luminex Corporation, Austin, TX) unter zur Hilfenahme der xMAP Technologie. Die Analyse der einzelnen Ansätze erfolgte genau nach Angabe des Herstellers.

Das Testprinzip beruhte auf der Inkubation von mit anti-Zytokinantikörpern beschichteten, 5,6 µm großen, „beads“ mit den Zellüberständen. Die Messung der unterschiedlichen Zytokine erfolgte dann mittels Durchflusszytometrie. Dabei wurde nach Anregung der „beads“ durch einen roten Laser (635 nm) die Identität des „beads“ durch Auslesen des Rot- und Infrarotbereichs bestimmt. Die Menge des gebundenen Zytokins wurde durch Zunahme der Fluoreszenzintensität nach Anregung desselben „beads“ durch einen grünen Laser (532 nm) errechnet. Somit war es mittels dieser Technology möglich, die zu untersuchenden Zytokine, gleichzeitig aus dem jeweiligen Ansatz auszulesen.

2.2.3.1.3 CD107a Assay

1,5x10⁵ antigenspezifische CD8⁺ CTL/ well wurden auf eine 96-well Rundbodenplatte ausgebracht. Vor Beginn der Stimulation wurden 12,5 µl eines α-CD107a PE-Cy5 Antikörpers (BD, Heidelberg) in jeden Ansatz gegeben und die Proben 5 h später geerntet. Anschließend wurden die Zellen gefärbt und sofort im Durchflusszytometer analysiert.

2.2.3.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient der Detektion von zellgebundenen Farbstoffen und lieferte phänotypische Aussagen über die gefärbten Zellen. Dabei wurden die Zellen in einer Trägerflüssigkeit an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Bei den verwendeten Geräten FACSCalibur (BD, Heidelberg) und EPICSXL-MCL (Beckman Coulter, Krefeld) standen zwei (Argon- und UV-Laser) bzw. ein Laser (Argon-Laser) für die Anregung der Farbstoffe zur Verfügung. Die Emission der Farbstoffe wurde in vier Kanälen gemessen. Außerdem wurde die Lichtstreuung jeder Zelle detektiert: das sog. "Vorwärts-Streulicht" (FSC) lieferte

Information über die Größe der Zellen, das sog. "Seitwärts-Streulicht" (SSC) vermittelte Information über die Granularität der Zelle. Zusammengenommen wurden damit für jede Zelle sechs Parameter ermittelt. Als Farbstoffkonjugate wurden z.B. FITC (Fluorothioisocyanat), PE (Phycoerythrine), PerCP und APC (Allophycocyanine) verwendet. Außerdem konnten im FACS Membranfarbstoffe (PKH67, PKH26) sowie PI, als auch 7-AAD detektiert werden.

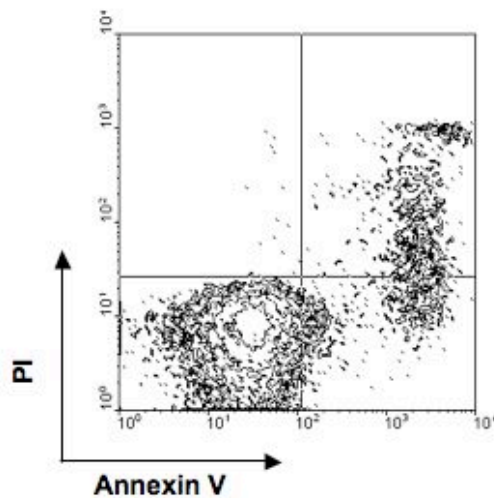
2.2.3.2.1 Antikörperfärbung

Die zu untersuchenden Zellen oder „beads“ ($0,15 - 1 \times 10^6$) wurden in FACS-Röhrchen (Falcon/BD, Franklin Lakes, USA) gegeben und in FACS-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die vom Hersteller angegebene Menge an Antikörpern auf das resuspendierte (100 µl FACS-Waschpuffer) Zellpellet pipettiert und 15 min bei 4 - 8 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation mit FACS-Waschpuffer wurden die Zellen in 200 - 500 µl PBS oder Fixierungslösung aufgenommen. Die Analyse erfolgte mit einem FACSCalibur (BD, Heidelberg) oder dem EPICSXL-MCL (Beckman Coulter, Krefeld) Durchflusszytometer. Die Daten wurden mit der Software WinMDI2.8, FACSExpress 3 oder FlowJo ausgewertet.

2.2.3.2.2 Apoptosefärbung

Prinzip:

Ein frühes Ereignis nach Apoptoseinduktion in einer Zelle ist die Translokation von Phosphatidylserin von der Innenseite der Zellmembran auf deren Außenseite. Die Verschiebung dieses Phospholipids kann durch die Anlagerung des spezifischen Moleküls Annexin V durchflusszytometrisch nachgewiesen werden^{211,212}. Da dieses Molekül aber auch in nekrotischen Zellen bindet, muss zusätzlich zu der Annexin V Färbung noch eine Färbung mit einem DNA-markierenden Farbstoff wie z. B. Propidiumjodid (PI) oder 7-actinomycin D (7-AAD) durchgeführt werden. Sowohl PI als auch 7-AAD gelangen nur nach Zerstörung der Zellmembran in die Zelle und interkalieren dort in die DNA. Bei der Darstellung der doppelt gefärbten Zellen in einer Zweiparameterdarstellung kann man dann apoptotische und nekrotische von vitalen Zellen unterscheiden (**Abbildung 4**).



Annexin V⁻/PI⁻ = lebende Zellen

Annexin V⁺/PI⁻ = frühe Apoptose

Annexin V⁺/PI⁺ = späte Apoptose

Abbildung 4: Exemplarische Annexin V und Propidiumjodid (PI) Färbung.

Durchführung:

Zur Detektion von Apoptose wurden Zellen mit eiskaltem PBS (PAN, Aidenbach) gewaschen (300x g, 10 min, 4°C). Bei der Verarbeitung der Proben war eine durchgehende Kühlung sehr wichtig, da Apoptose ein enzymatischer, energieabhängiger Prozess ist und durch eine Erhöhung der Temperatur das Ergebnis hätte beeinflusst werden können. Die Proben wurden in 100 µl Annexinbindepuffer resuspendiert und mit entweder 10 µl PI Lösung (50 µg/ml in PBS) oder 5 µl 7-AAD (BD, Heidelberg) sowie 5 µl Annexin V (Caltag, Hamburg) für 15 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von weiteren 250 µl Annexinbindepuffer wurden die Proben innerhalb einer Stunde im Durchflusszytometer analysiert.

2.2.3.2.3 MHC-Tetramerfärbung

Zum Nachweis antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen wurden die Zellen einmal mit FACS-Waschpuffer gewaschen und danach mit 2 µl/ 10⁶ Zellen des jeweiligen HLA-A*0201-Tetramers inkubiert (30 min/ RT). Im Anschluss daran wurde die Oberflächenfärbung gegen weitere Antigene mit direktkonjugierten Antikörpern durchgeführt, ohne das HLA-A*0201-Tetramer vorher abzuwaschen. Nach der Inkubationszeit der Antikörperfärbung wurden die Zellen mit FACS-Waschpuffer gewaschen und im Durchflusszytometer analysiert.

2.2.3.2.4 PKH67/26 Färbung

Die Beladung von bis zu 10×10^6 T-Zellen erfolgte in 15 ml Polystyrenröhrchen. Zu Beginn wurden die Zellen dreimal mit RPMI_{minus} gewaschen und anschließend in 500 ml/ 1×10^7 Zellen Diluent C (Sigma, München) resuspendiert. Die Färbelösung wurde jeweils frisch vor der Beladung hergestellt: 2 μ l PKH67 oder PKH26 (1 mM in Ethanol, Sigma, München) wurden in 500 μ l Diluent C in einem frischen 15 ml Polystyrenröhrchen aufgenommen. Im Beladungsschritt wurde die Färbelösung tropfenweise unter Schütteln der Zellsuspension zugegeben. Anschließend wurden die Zellen 7 min bei RT auf dem Schüttler (700 rpm) inkubiert. Die Beladung wurde mit 2 ml humanem AB-Serum 2 min lang abgestoppt und dann 10 ml T-Zell-Medium hinzugegeben. Dieser Schritt war notwendig um den Großteil der noch verbleibenden Farbstoffmoleküle an Serumprotein abzubinden. Anschließend wurden die beladenen Zellen 3x je in 1 ml humanem AB-Serum resuspendiert und unter Zugabe von je 12 ml T-Zell-Medium gewaschen. Die in T-Zell-Medium aufgenommenen PKH67⁺ oder PKH26⁺ T-Zellen wurden gezählt, durchflusszytometrisch charakterisiert (**Abbildung 5**) und fanden in den entsprechenden Versuchen Verwendung.

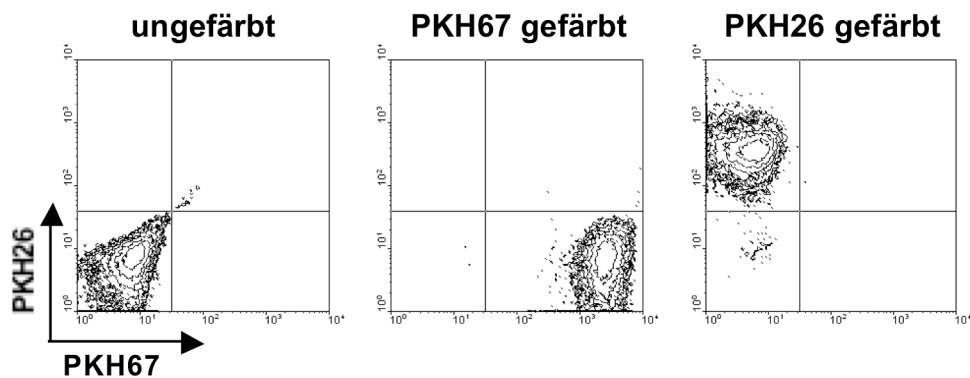


Abbildung 5: Exemplarische Darstellung von PKH67 bzw. PKH26 gefärbten antigenspezifischen CD8⁺ CTL.

3. Ergebnisse

3.1 Konzept der Killer-artifiziellen-antigenpräsentierenden Zelle (KaAPC)

2003 publizierte Oelke et al. die erfolgreiche Generierung einer „bead“-basierten aAPC²¹⁰. Grundlage dieser aAPC war ein paramagnetischer Epoxybead, auf dessen Oberfläche kovalent α -CD28 Antikörper und ein HLA-A₂-Ig Dimer gebunden waren. Durch die Kombination dieser beiden Signale konnte eine effektive Expansion antigenspezifischer humaner CD8⁺ T-Zellen verschiedener Spender erreicht werden. Diese war vergleichbar und in einigen Fällen sogar besser als die Generierung antigenspezifischer humaner CD8⁺ T-Zellen unter Verwendung humaner DC. Aufbauend auf diesen Daten und auf Grundlage der von unserer Arbeitsgruppe publizierten Arbeiten zur peripheren Toleranzinduktion durch Fas/FasL vermittelten Apoptoseinduktion in humanen CD8⁺ T-Zellen^{170,171,213} entwickelten wir in Kooperation mit Oelke et al. ein Konzept zur Generierung einer Killer-artifiziellen-antigenpräsentierenden Zelle (KaAPC).

Grundlage dieser KaAPC war ein paramagnetischer Epoxybead, auf dessen Oberfläche sich kovalent immunologisch aktive Moleküle über deren Aminogruppen (-NH₂) binden ließen. Dabei war es jedoch nicht möglich, eine gerichtete Bindung der einzelnen Moleküle sicherzustellen. Kovalente Bindungen können potentiell zwischen allen vorhandenen Aminogruppen ausgebildet werden, was zu einer statistischen Verteilung der Bindungsrichtung der Moleküle führt. Es ist somit denkbar, dass zumindest ein Teil der Moleküle direkt mit ihren aktiven Zentren an die „bead“-Oberfläche konjugiert waren und somit nur eingeschränkt oder gar nicht ihre Funktion ausüben konnten. Trotz allem sollten aber noch ausreichend viele, voll funktionsfähige Moleküle vorhanden sein, wie die Generierung von funktionellen aAPC beweist.

Zur erfolgreichen, antigenspezifischen Eliminierung von humanen, antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen sollte auf diesen „beads“ sowohl ein apoptoseinduzierendes Signal als auch ein antigenspezifisches Signal den CD8⁺ T-Zellen präsentiert werden.

Zur Sicherstellung einer antigenspezifischen Bindung zwischen der KaAPC und dem T-Zellrezeptor (TCR) der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen wurden auf den „beads“ so genannte HLA-A₂-Ig Dimere gebunden. Hierbei handelt es sich um ein Fusionsprotein, bei dem die extrazellulären Teile zweier humaner HLA-A₂ Moleküle an die konstante Region der

schweren Kette eines murinen Immunglobulins (IgG1), über eine kurze Verbindungssequenz gebunden sind. **Abbildung 6** zeigt eine schematische Darstellung eines solchen Moleküls.

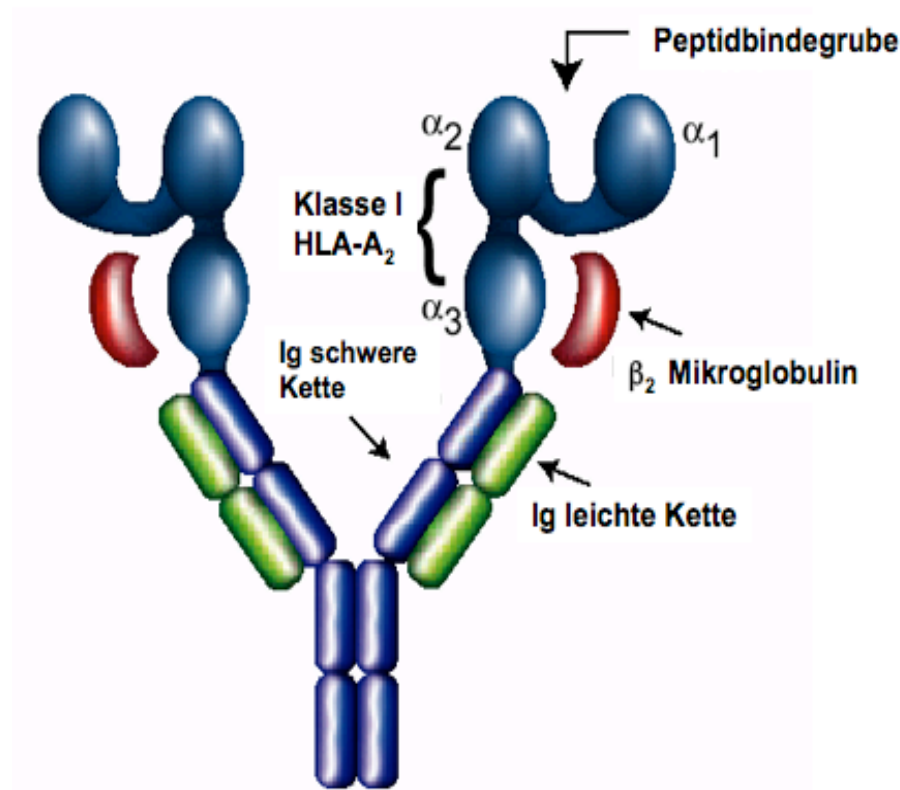


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines HLA-A₂-Ig Dimer Moleküls. Modifiziert nach Oelke et al.¹⁹⁴

HLA-A₂-Ig Dimere sind sehr stabil und können über lange Zeit bei 4 °C gelagert werden. Ebenso kann man mit ihnen, ähnlich wie mit Tetrameren, antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch nachweisen²¹⁴. Zur Erzeugung einer antigenspezifischen Interaktion zwischen TCR und HLA-A₂-Ig Dimer können diese in ihrer Peptidbindegrube HLA-A₂ restringierten Peptide binden, welche dann exogen zugeführt werden. Hierfür verwendeten wir die beiden humanen Modellantigene CMV_{pp65} (NLVPMVATV) und Mart-1 (ELAGIGILTV).

Zusätzlich wurde auf den KaAPC ein apoptoseinduzierendes Signal aufgebracht. Hierzu verwendeten wir einen α-Fas Antikörper (Klon CH11). Dieser spezifische Antikörper ist aufgrund seines IgM Isotyps befähigt, schon in seiner löslichen Form in Fas⁺ Zellen Apoptose zu induzieren. Eine zusätzliche Vernetzung der einzelnen Antikörpermoleküle ist hierfür nicht

erforderlich. **Abbildung 7** zeigt eine schematische Darstellung des zugrunde liegenden Konzepts der KaAPC.

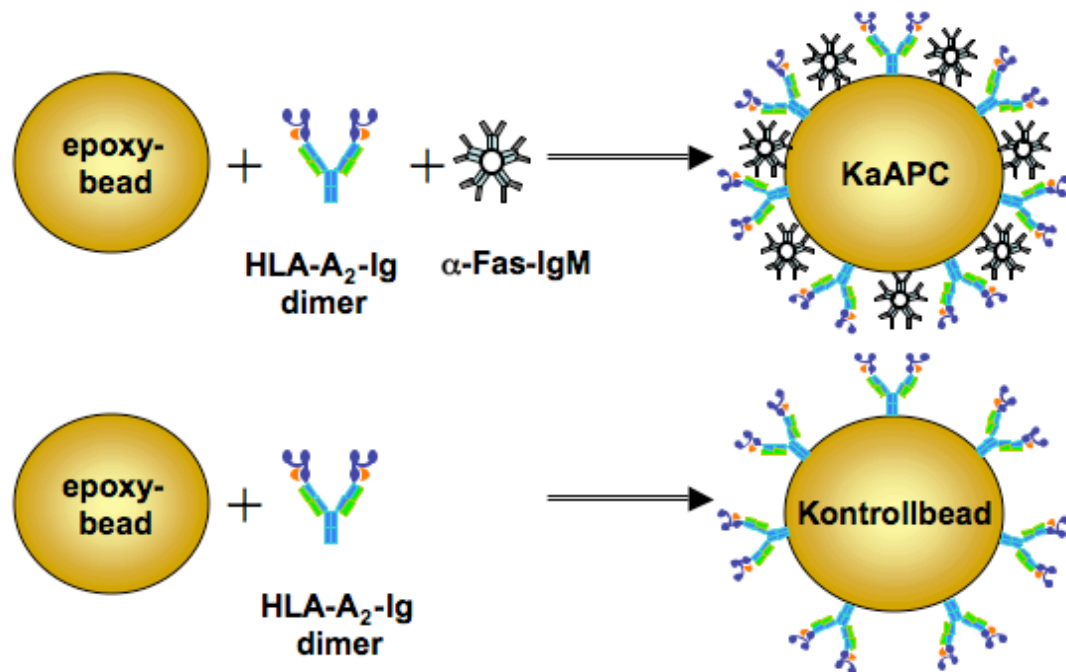


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Konzepts zur Generierung von KaAPC und Kontrollbeads (c.b.).

Um die Auswirkungen der beiden Signale, auf die antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen genau untersuchen zu können, wurden so genannte Kontrollbeads (c.b.) hergestellt. Diese wiesen die gleiche Menge an HLA-A₂-Ig Dimer wie ihre korrespondierenden KaAPC auf, jedoch fehlte ihnen der α-Fas Antikörper. Das erlaubte uns die genaue Evaluierung der induzierten Apoptose in CD8⁺ T-Zellen hinsichtlich ihrer Vermittlung über den Fas/FasL Signalweg. Eine unterschiedliche Beladung sowohl der KaAPC als auch der c.b. gab Aufschluss darüber, ob eine antigenspezifische oder allgemeine Induktion von Apoptose zugrunde lag.

Da aAPC zur effektiven Aktivierung und anschließender Expansion der CD8⁺ T-Zellen neben dem antigenspezifischen Signal ein zusätzliches, kostimulatorisches Signal aufweisen, wurden initiale Versuche durchgeführt, in denen zusätzlich zu dem antigenspezifischen und dem apoptoseinduzierenden Signal einer KaAPC, α-CD28 Antikörper auf der „bead“-Oberfläche immobilisiert wurde. Jedoch führte das zusätzlich eingebrachte kostimulierende Signal vermehrt zu aktivierungsinduzierten Zelltod (AICD) in CD8⁺ T-Zellen. Insbesondere konnte eine deutliche Induktion von AICD in T-Zell-Kokulturen mit α-CD28 Antikörpern beschichteten c.b. nachgewiesen werden. Da dadurch die Vitalität der T-Zellen schon in den

Kontrollansätzen deutlich verringert war, hätte dieser Umstand die Charakterisierung eines optimalen, zur antigenspezifischen Eliminierung befähigten KaAPC-Phänotyps bedeutend erschwert (Daten nicht gezeigt). Daher wurde auf die Integration eines zusätzlichen kostimulierenden Signals wie z.B. α -CD28 Antikörper für die Dauer der Charakterisierung eines optimalen, funktionellen KaAPC-Phänotyps verzichtet.

3.2 Wahl des richtigen T-Zell-Kokulturmediums

Ausschlaggebend für die Generierung und Charakterisierung eines funktionellen KaAPC-Phänotyps war die Qualität des verwendeten Zellmaterials. Durch die standardisierte Generierung antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen (2.2.2.4) wurde eine gleichbleibend hohe Antigenpezifität der T-Zellen sichergestellt (**Abbildung 3**).

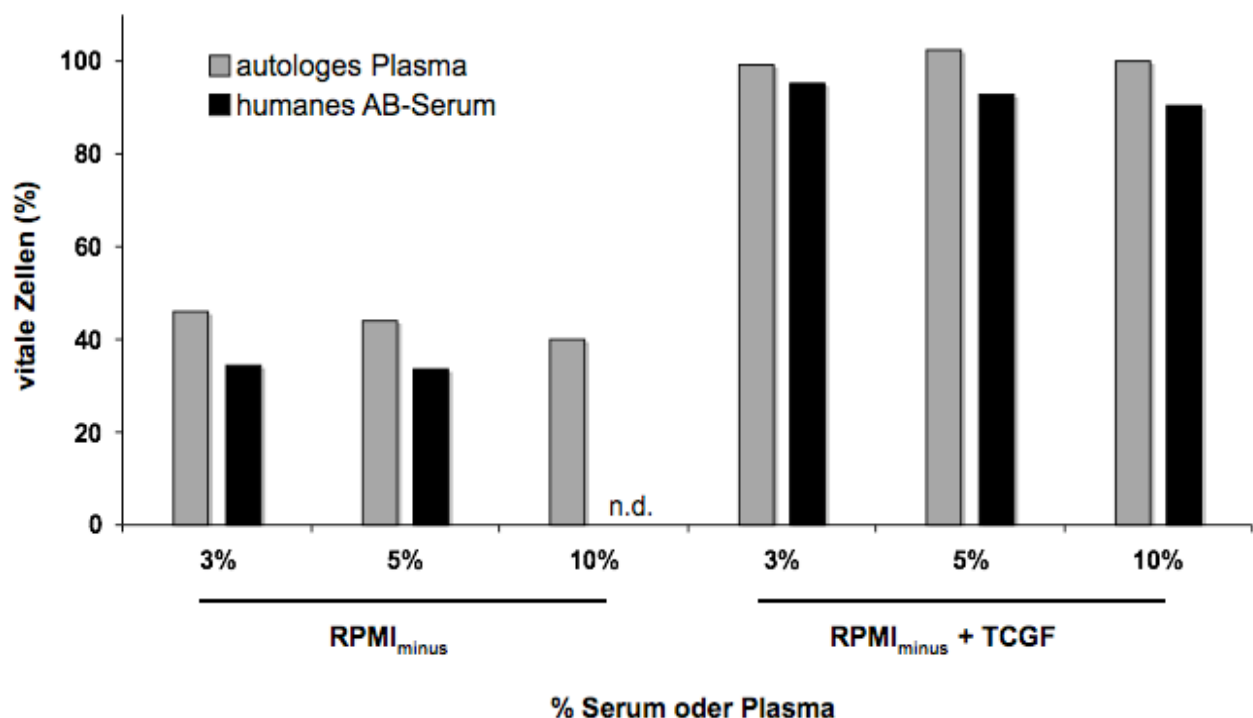


Abbildung 8: Evaluierung des T-Zell-Kokulturmediums mit der geringsten Hintergrundapoptose. Antigen-spezifische CTL wurden in unterschiedlichen Medien ($\text{RPMI}_{\text{minus}}$, $\text{RPMI}_{\text{minus}} + \text{TCGF}$) inkubiert unter gleichzeitiger, prozentualer Variation (3 %, 5 %, 10 %) der Mengen an autologem Plasma oder humanem AB-Serum. Nach 48 h wurden die einzelnen Ansätze geerntet und zur Ermittlung der Apoptoserate mit Annexin V/PI gefärbt. Dargestellt ist die relative, prozentuale Vitalität der CTL in den einzelnen Ansätzen im Bezug zu deren Vitalität zur Stunde 0.

Da jedoch die Induktion von spezifisch vermittelter Apoptose als wesentliche Methode zur Bestimmung eines optimalen KaAPC-Phänotyps dienen sollte, mussten die Kokulturbedingungen so angepasst werden, dass sich eine möglichst hohe Vitalitätsrate bei den unstimulierten, antigenspezifischen $CD8^+$ T-Zellen zeigte. **Abbildung 8** zeigt ein repräsentatives Experiment zur Wahl eines optimalen T-Zell-Kokulturbediums.

Aktivierte, antigenspezifische $CD8^+$ T-Zellen eines Spenders wurden in unterschiedliche Medien (X-Achse) aufgenommen und deren Auswirkung auf die Vitalität der Zellen nach 48 stündiger Inkubation überprüft. Die durch Annexin V/PI Färbung ermittelte Vitalität (Annexin V/PI) der $CD8^+$ T-Zellen zur Stunde 0 diente als Referenzwert. Es stellte sich heraus, dass zur Aufrechterhaltung der Vitalität aktivierter $CD8^+$ T-Zellen eine Kombination aus $RPMI_{\text{minus}}$ + TCGF am besten geeignet ist. Konnte man unter Verwendung von $RPMI_{\text{minus}}$ alleine eine ungefähr 50 %-ige Abnahme der Vitalität beobachten, so führten die im TCGF enthaltenen Zytokine (2.2.1.3) zu einer fast vollständigen Aufrechterhaltung der Vitalität der antigenspezifischen $CD8^+$ T-Zellen. Nur unter Verwendung von 5 % bzw. 10 % humanen AB-Serums konnte eine maximal 10 %-ige Verschlechterung detektiert werden, wohingegen der Zusatz von 3 % humanen AB-Serums bzw. autologen Plasmas (3 %, 5 %, 10 %) keine Abnahme der Vitalität der Zellen erkennen ließ. Bei in $RPMI_{\text{minus}}$ allein kultivierten $CD8^+$ T-Zellen konnte sowohl durch eine Variation zwischen humanen AB-Serum und autologem Plasma, als auch durch die Variation derer prozentualen Anteile am T-Zell-Kokulturbedium keine deutliche Verbesserung der Vitalität erzielt werden.

In Anbetracht dieser Ergebnisse wurde T-Zell-Kokulturbedium, bestehend aus $RPMI_{\text{minus}}$ + TCGF und 3 % humanem AB-Serum in jedem zur Generierung und Charakterisierung eines funktionellen KaAPC-Phänotyps durchgeführten Experiment verwandt. Humanes AB-Serum wurde autologem Plasma vorgezogen, da dieses nur in begrenzten Mengen zur Verfügung stand und möglicherweise hohe Spendervariabilitäten aufwies.

3.3 Ausschaltung der Effekte löslichen Peptids auf die CTL-Kokulturen

Seit längerer Zeit ist bekannt, dass durch freies Peptid Apoptose in antigenspezifischen $CD8^+$ T-Zellen ausgelöst werden kann. Dabei ist der Grad der induzierten Apoptose abhängig von der jeweiligen Peptidkonzentration. Dieser Effekt kann jedoch durch die Zugabe eines irrelevanten Peptids vermindert werden. Ursache dafür ist die autologe Präsentation der

Peptide auf Selbst-HLA-Molekülen, welches zur Selbsterkennung und in Folge dessen zur Selbstzerstörung der $CD8^+$ T-Zellen führt^{215,216}.

Da sowohl die KaAPC als auch die c.b. mit korrespondierendem Peptid beladen werden mussten, um im Falle der KaAPC eine antigenspezifische Elimination der $CD8^+$ T-Zellen zu erreichen, war es notwendig, die beschriebenen Effekte in unseren T-Zell-Kokulturen zu minimieren.

3.3.1 Peptidtitrationskurve

Initial sollte die minimale Menge an korrespondierendem Peptid bestimmt werden, die nicht mehr zur Apoptoseinduktion in antigenspezifischen $CD8^+$ T-Zellen führte. Dies wurde durchgeführt, um leichter abschätzen zu können, ob eine Entfernung des Peptids aus den einzelnen Beladungsansätzen der KaAPC und c.b. erforderlich war (2.2.1.2.5). Hierzu wurden CMV_{pp65} spezifische $CD8^+$ T-Zellen in je 200 μ l T-Zell-Kokulturmedium aufgenommen und mit unterschiedlichen Mengen an löslichem CMV_{pp65} -Peptid kokultiviert. **Abbildung 9** zeigt ein repräsentatives Experiment.

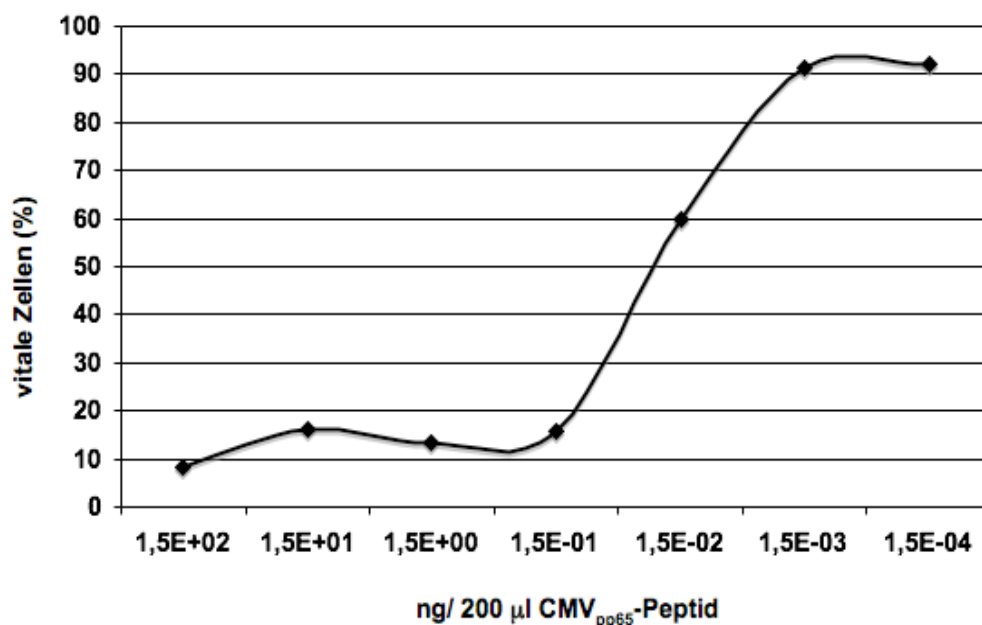


Abbildung 9: Peptidtitrationskurve zur Ermittlung der geringsten, in antigenspezifischen CTL noch Apoptose induzierenden Konzentration an korrespondierendem Peptid. CMV_{pp65} spezifische CTL wurden mit den auf der X-Achse angegebenen Mengen an löslichem CMV_{pp65} -Peptid inkubiert. Nach 48 h wurden die einzelnen Ansätze geerntet und zur Bestimmung der Apoptoserate Annexin V/PI gefärbt. Dargestellt ist die relative, prozentuale Vitalität (% vitale Zellen = (% behandelte, vitale Zellen x 100%)/% unbehandelte, vitale Zellen).

Nach 48 h wurden die einzelnen Ansätze geerntet und mittels Annexin V/PI Färbung die Apoptoserate bestimmt. 1 µg/ml Mart-1 Peptid diente als Negativkontrolle, die nach 48 h keine erhöhte Apoptoserate aufwies, im Vergleich zu unstimulierten CMV_{pp65} spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Dargestellt ist die Menge vitaler Zellen in Bezug auf eine unstimulierte Kontrolle nach 48 h. Die Induktion von peptidvermittelter Apoptose in antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen zeigte einen sigmoiden Verlauf. Schon eine Menge von 0,0075 - 0,075 ng/ml löslichem CMV_{pp65}-Peptid führte zu einer Abnahme der Vitalität der CMV_{pp65} spezifischen CD8⁺ T-Zellen um bis zu 40 %, und eine Peptidkonzentration von nur 0,75 ng/ml resultierte schon in einem 90 %-igen Verlust der T-Zellvitalität. Da schon so geringe Mengen an löslichem, korrespondierenden Peptid zur effektiven Induktion von peptidvermittelter Eigenapoptose genügten, ergab sich die dringende Notwendigkeit die einzelnen KaAPC und c.b. Beladungsansätze vor Einbringung in die T-Zell-Kokultur vom jeweiligen, löslichen Peptid zu befreien, um eine negative Beeinflussung der Vitalitätsdaten auszuschließen.

3.3.2 Untersuchung der Waschkonditionen für die funktionellen KaAPC und Kontrollbeads

Zur Ermittlung eines effizienten Waschprotokolls wurden antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen mit Proben der einzelnen Waschschrte inkubiert. Zur Entfernung des löslichen Peptids aus den Beladungsansätzen der KaAPC und c.b. wurden die einzelnen Ansätze mit PBS gewaschen. Hierzu wurden die Glasröhrchen mit den sich darin befindlichen „beads“ für 2 min auf einen Magneten gespannt. Danach wurde der so gewonnene Überstand abgenommen und 1 ml frisches PBS zugegeben. Die Beladungsansätze wurden dann, vor der erneuten Inkubation auf dem Magneten, vollständig resuspendiert. Dieser Vorgang wurde bis zu 7x wiederholt. Zur Durchführung des Experiments wurden die abgenommenen Überstände nach jedem einzelnen Waschschrte aufbewahrt. Anschließend wurden je 15 µl des jeweiligen Überstandes mit den sich in 200 µl T-Zell-Kokulturmedium befindlichen antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen kokultiviert. Dieses Volumen entsprach in etwa der Menge des mittransferierten Volumens an PBS bei Ansatz einer Kokultur mit antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen bei einem „bead“ zu T-Zell Verhältnis von 1:1, da die KaAPC bzw. c.b. zuvor auf eine Konzentration von 1×10^7 /ml eingestellt wurden. Als Positivkontrolle wurden 15 µl des initialen Beladungsansatzes (Bel.) verwendet, wohingegen unstimulierte CD8⁺ T-Zellen als Negativkontrolle dienten. Nach 48 h wurden die einzelnen Ansätze geerntet und mit Annexin

V/PI die Vitalität der T-Zellen bestimmt. **Abbildung 10** zeigt die gemittelten Daten aus fünf unabhängigen Experimenten mit Mart-1 und CMV_{pp65} spezifischen CD8⁺ T-Zellen.

In allen Experimenten ließ sich schon nach 3 – 4 Waschschritten eine deutliche Reduktion der Toxizität der Waschüberstände feststellen (60 – 70 % vitale Zellen) im Vergleich zu den Kokulturen mit dem Beladungsansatz (15 % vitale Zellen). Jedoch erst nach dem 6. Waschschriff konnte keinerlei Toxizität der Überstände nachgewiesen werden, die über die normale Hintergrundapoptose hinaus ging (95 % vitale Zellen).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die weiteren Experimente zur optimalen Entfernung des löslichen Peptids aus den Beladungsansätzen sechs aufeinander folgende Waschschriffe gewählt, wobei die KaAPC bzw. c.b. nach dem letzten Waschschriff in 1 ml frischen PBS aufgenommen wurden und anschließend eine Konzentration von 1×10^7 /ml eingestellt wurde. Dieses Protokoll stellte in der Folge aller weiteren Experimente sicher, dass die ermittelte Vitalität der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen ausschließlich durch die Kokultur mit den KaAPC bzw. c.b. beeinflusst wurde und nicht durch die ungewollte Interaktion von löslichem Peptid mit den, für dieses Peptid spezifischen CD8⁺ T-Zellen.

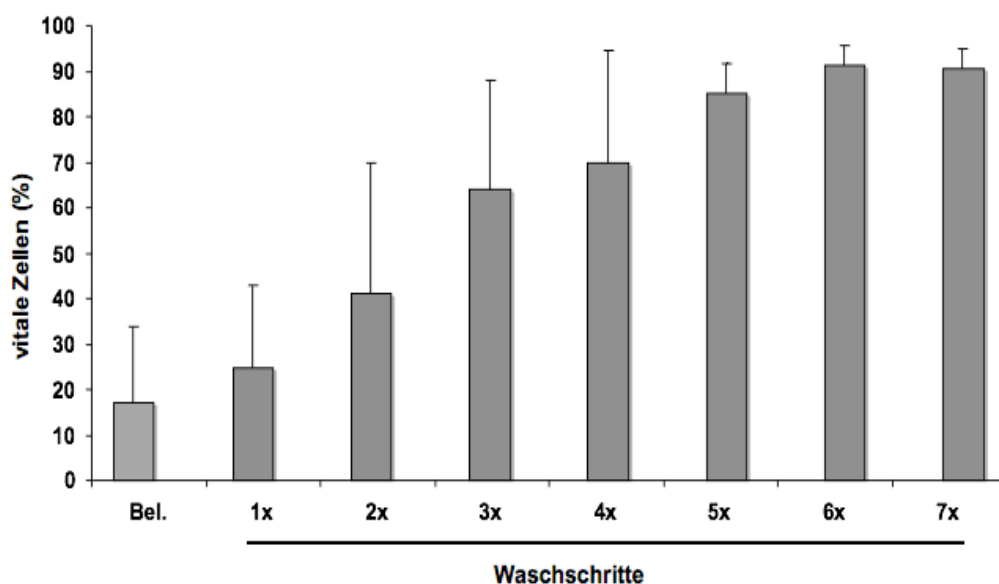


Abbildung 10: Ermittlung der Toxizität verbleibender Peptidmengen in den Beladungsansätzen der KaAPC und c.b.. KaAPC und c.b. wurden mit gleichen Mengen an CMV_{pp65}-Peptid beladen und dann bis zu 7x gewaschen. Dabei wurde von jedem Waschschriff der Überstand asserviert und gleiche Volumina zur Kokultur mit CMV_{pp65} spezifischen CTL eingesetzt. Ebenso wurde der Beladungsansatz (Bel.) der KaAPC bzw. c.b. auf CMV_{pp65} spezifischen CTL getestet. Nach 48 h Kokultur wurden die einzelnen Ansätze geerntet und zur Bestimmung der Apoptoserate Annexin V/PI gefärbt. Dargestellt ist die relative, prozentuale Vitalität (% vitale Zellen = (% behandelte, vitale Zellen x 100%)/% unbehandelte, vitale Zellen) (Mittelwert ± SD).

3.4 Titration des funktionellen KaAPC-Phänotyps

Nach der Optimierung der Kokulturbedingungen wurden verschiedene Phänotypen einer KaAPC hergestellt und funktionell charakterisiert. Hierzu wurden auf den KaAPC sowohl das antigenspezifische, als auch das apoptoseinduzierende Signal titriert. Dabei wurde immer eines der Signale konstant gehalten. Während der Titrationsen wurden sowohl die Menge der zu beladenen „beads“ (100×10^6) als auch das Beladungsvolumina (550 μ l) konstant gehalten. Die Kontrolle der Beladung erfolgte durch eine phänotypische Charakterisierung mittels spezifischer Färbung des HLA-A₂-Ig Dimers durch α -Maus-IgG1 PE Antikörper. Der α -Fas Antikörper wurde mittels α -Maus-IgM FITC Färbung durchflusszytometrisch nachgewiesen. Die Quantifizierung der Signalstärke erfolgte unter Verwendung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) für die jeweiligen Konjugate. Die so entstandenen Phänotypen wurden nach Beladung mit unterschiedlichen Peptiden in Kokulturen antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen hinsichtlich ihrer Effizienz getestet.

Abbildung 11 ist die Zusammenfassung der Ergebnisse aus mehreren Titrationsversuchen, die die hauptsächlichen funktionellen Charakteristika der einzelnen KaAPC-Phänotypen darstellt. Die in **Tabelle 1** dargestellten Daten geben einen Überblick über die unter **Abbildung 11A** und **Abbildung 11B** getesteten Phänotypen (MFI und μ g/550 μ l).

In der rechten Tabelle finden sich KaAPC, deren Menge an HLA-A₂-Ig Dimer immer 0,01 μ g/550 μ l betrug, jedoch die Menge an α -Fas Antikörpern von 0,5 – 8 μ g/550 μ l variiert wurde. Dabei ergab sich für den HLA-A₂-Ig Dimer eine mittlere MFI von $4,28 \pm 1,48$. Die MFI des nachgewiesenen α -Fas Antikörper stieg mit zunehmender Menge von 4,71 auf 17,95 an. Diese Phänotypen fanden Verwendung in dem unter **Abbildung 11A** dargestellten Experiment.

Die linke Tabelle zeigt die Phänotypen der einzelnen KaAPC, die durch Titration der Menge an HLA-A₂-Ig Dimer (0,001 – 1 μ g/550 μ l) entstanden. Dabei wurde die Menge des verwendeten α -Fas Antikörpers konstant bei 2 μ g/550 μ l belassen. Die sich daraus ergebende mittlere MFI betrug $5,73 \pm 0,86$, wohingegen die MFI für den HLA-A₂-Ig Dimer mit zunehmender Menge von 2,8 auf 43,91 anstieg. Die in dieser Tabelle beschriebenen Phänotypen fanden Verwendung in dem unter **Abbildung 11B** gezeigten Experiment.

Titration der α -Fas Menge auf je 100×10^6 KaAPC (A)			Titration der HLA-A ₂ -Ig dimer Menge auf je 100×10^6 KaAPC (B)		
α -Fas	MFI	0,01 μ g HLA-A ₂ -Ig dimer (MFI)	HLA-A ₂ -Ig dimer	MFI	2 μ g α - Fas (MFI)
0,5 μ g	4,71	2,88	0,001 μ g	2,8	5,63
1 μ g	3,91	3,43	0,005 μ g	3,08	4,63
2 μ g	5,44	3,7	0,01 μ g	3,7	6,88
5 μ g	11,45	4,73	0,05 μ g	4,98	6,21
8 μ g	17,95	6,64	1 μ g	43,91	5,3

Tabelle 1: Übersicht über die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der einzelnen immobilisierten Effektormoleküle auf den unterschiedlichen KaAPC-Phänotypen. Die Tabellen geben einen vergleichenden Überblick über die Menge und mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der auf den einzelnen KaAPC durchflusszytometrisch nachgewiesenen, gebundenen HLA-A₂-Ig Dimer oder α -Fas Antikörper.

In **Abbildung 11A** und **11B** wurden CMV_{pp65} spezifische CD8⁺ T-Zellen mit unbeladenen, Mart-1 beladenen oder CMV_{pp65} beladenen KaAPC-Phänotypen inkubiert. Die Kokultur erfolgte für 48 h in je 200 μ l T-Zell-Kokulturbedium. Danach wurden die einzelnen Ansätze geerntet und die Vitalität der CD8⁺ T-Zellen mittels Annexin V/PI Färbung bestimmt. Als Negativkontrolle diente ein unstimulierter T-Zellansatz.

Variierte man die Menge des α -Fas Antikörpers auf den KaAPC so sah man, dass schon CMV_{pp65}KaAPC mit nur 0,5 μ g α -Fas die Vitalität der CMV_{pp65} spezifischen CD8⁺ T-Zellen um bis zu 50 % reduzierten (**Abbildung 11A**). Eine weitere Erhöhung der Menge auf 1 μ g α -Fas (10 % vitale Zellen) bis zu 8 μ g (2 % vitale Zellen) brachte keine deutlichere, spezifische Verringerung der Vitalität der CMV_{pp65} spezifische CD8⁺ T-Zellen. Somit erwiesen sich 1 – 8 μ g α -Fas Antikörper auf den CMV_{pp65}KaAPC gleich effizient. Betrachtete man die unbeladen_{KaAPC} und Mart-1_{KaAPC}, so sah man, dass diese die Vitalität der CMV_{pp65} spezifischen CD8⁺ T-Zellen bei einer Menge von 0,5 – 2 μ g α -Fas nicht, oder nur marginal beeinflussten. Jedoch bei 5 – 8 μ g α -Fas führten sie zu einer deutlichen, unspezifischen Reduktion (35 - 20 % vitale Zellen) der Vitalität.

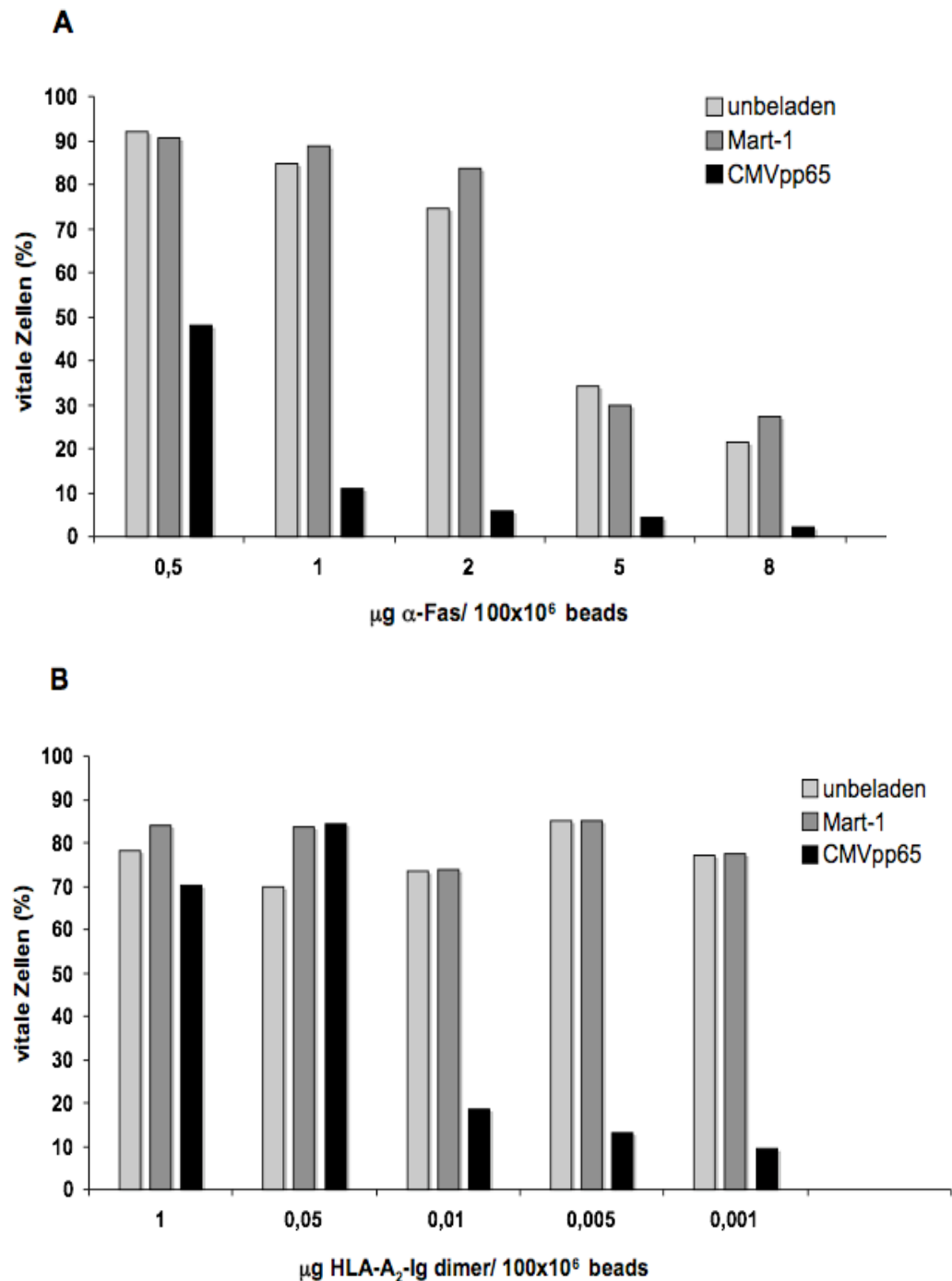


Abbildung 11:

Titration der einzelnen Effektmoleküle auf den KaAPC zur Ermittlung eines optimalen funktionellen Phänotyps. Die in Tabelle 1 dargestellten KaAPC-Phänotypen fanden weitere Verwendung in unter (A) bzw. (B) dargestellten Kokulturrexperimenten. Die einzelnen KaAPC-Phänotypen wurden entweder unbeladen oder mit Mart-1 und CMV_{pp65}-Peptid beladen in Kokulturrexperimente mit CMV_{pp65} spezifischen CTL eingesetzt. Nach 48 h wurden die einzelnen Ansätze geerntet und zur Bestimmung der Apoptoserate mit Annexin V/PI gefärbt. Dargestellt ist die relative, prozentuale Vitalität (% vitale Zellen = (% behandelte, vitale Zellen x 100%)/% unbehandelte, vitale Zellen). Unter (A) ist der Einfluss variierender Mengen an α -Fas Antikörper dargestellt, wohingegen in (B) der Einfluss variierender Mengen an HLA-A₂-Ig Dimer gezeigt wird.

Daher konnte man schließen, dass die optimale Menge an α -Fas Antikörper 2 μg betrug, da bei diesem Phänotyp die durch CMV_{pp65} KaAPC vermittelte, spezifische Apoptose am höchsten und die durch unbeladen KaAPC und Mart-1 KaAPC vermittelte, unspezifische Apoptose noch nicht erhöht war.

Variierte man die Menge an HLA-A₂-Ig Dimer auf den einzelnen KaAPC-Phänotypen, so sah man bei Kokultur von CMV_{pp65} spezifischen CD8^+ T-Zellen mit unbeladen KaAPC und Mart-1 KaAPC keine erhöhte Induktion von unspezifischer Apoptose (**Abbildung 11B**). Betrachtete man jedoch die in Kokulturen mit CMV_{pp65} KaAPC vermittelte, spezifische Apoptose, so konnte man nur bei HLA-A₂-Ig Dimer-Mengen von 0,01 – 0,001 μg diese eindeutig in den T-Zellen nachweisen (20 – 10 % vitale Zellen). Höhere Konzentrationen an HLA-A₂-Ig Dimer (1 und 0,5 $\mu\text{g}/550 \mu\text{l}$) führten zu einem Verlust der Fähigkeit der entsprechenden CMV_{pp65} KaAPC-Phänotypen spezifische Apoptose in CMV_{pp65} spezifischen CD8^+ T-Zellen auszulösen (80 – 70 % vitale Zellen).

Somit ließ sich nach einer Reihe von Titrationsexperimenten der KaAPC-Phänotyp mit 2 μg α -Fas Antikörper und mit 0,01 μg HLA-A₂-Ig Dimer pro 100×10^6 „beads“ als derjenige evaluieren, der das größte Potential zu antigenspezifischen Eliminierung von antigenspezifischen CD8^+ T-Zellen aufwies. Dieser Phänotyp sollte in weiterführenden Experimenten funktionell charakterisiert werden. Ein entsprechender Kontrollbead wurde mit 0,01 μg HLA-A₂-Ig Dimer beladen und in den folgenden Kokulturexperimenten, vergleichbar zu den KaAPC, unbeladen oder mit Peptid beladen eingesetzt.

3.5 Funktionelle Charakterisierung des optimalen KaAPC-Phänotyps

3.5.1 Durchflusszytometrischer Phänotyp

Durch die Titration verschiedener KaAPC-Phänotypen konnten die optimalen Parameter zur Generierung einer funktionellen KaAPC bestimmt werden (0,01 μg HLA-A₂-Ig Dimer + 2 μg α -Fas Antikörper für je 100×10^6 „beads“). Durch die wiederholte Generierung des optimalen KaAPC-Phänotyps, sollte dessen phänotypische Stabilität untersucht werden. In weiterführenden Experimenten sollten die funktionellen Charakteristika dieses KaAPC-Phänotyps in Kokultur mit antigenspezifischen CD8^+ T-Zellen getestet werden.

Dazu wurde initial die Immobilisation der beiden Signale auf neu generierten „beads“ mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen. **Abbildung 12** zeigt einen optimalen KaAPC-Phänotyp und deren korrespondierenden Kontrollbead nach Färbung mit spezifischen monoklonalen Antikörpern. Zum Nachweis des α -Fas Antikörpers wurde FITC konjugierter α -Maus-IgM Antikörper eingesetzt (linke Spalte), wohingegen der HLA-A₂-Ig Dimer mit PE konjugierten α -Maus-IgG1 angefärbt wurde (rechte Spalte). Die grau hinterlegten Histogramme repräsentieren die Isotypfärbungen und die transparenten Histogramme die spezifischen Färbungen.

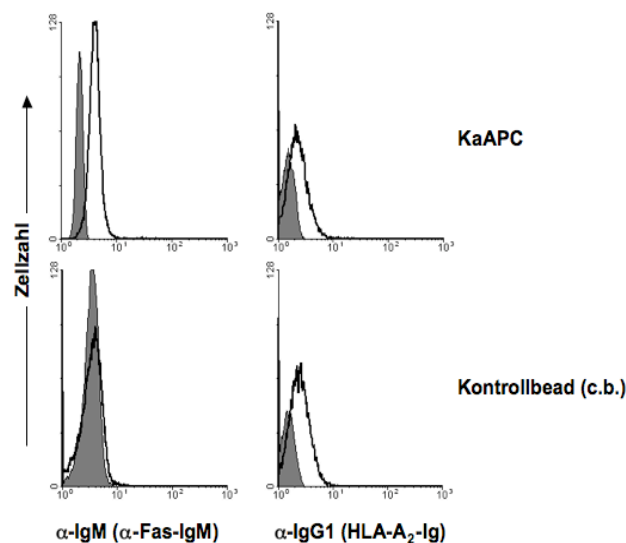


Abbildung 12: **Durchflusszytometrischer Phänotyp einer funktionellen KaAPC.** Sowohl KaAPC als auch die korrespondierenden Kontrollbeads (c.b.) wurden mit Ziege α -Maus IgM und Ziege α -Maus IgG1 gefärbt um die gebundenen Mengen an α -Fas Antikörpern und HLA-A₂-Ig Dimer zu bestimmen. Dargestellt ist ein funktioneller Phänotyp der KaAPC mit korrespondierendem c.b., welcher im Verlauf der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente näher charakterisiert wurde. Die grau ausgefüllten Histogramme repräsentieren die Isotypfärbungen, wohingegen die transparenten Histogramme die spezifischen Färbungen darstellen.

Der spezifische durchflusszytometrische Nachweis von HLA-A₂-Ig Dimer und α -Fas Antikörper ergab, dass beide Signale auf den „beads“ wiederholt und in vergleichbarer Stärke immobilisiert werden konnten. Fand sich der HLA-A₂-Ig Dimer in vergleichbaren Mengen sowohl auf der KaAPC als auch auf dem Kontrollbead, so konnte der α -Fas Antikörper nur auf der KaAPC nachgewiesen werden.

Der Phänotyp aller für die Durchführung der Experimente neu generierten KaAPC und Kontrollbeads wurde vor deren Verwendung in Kokultorexperimenten durchflusszytometrisch charakterisiert und war in jedem Fall vergleichbar.

3.5.2 Antigen-spezifische Depletion von CTL

Anschließend sollte getestet werden, ob KaAPC $CD8^+$ T-Zellen antigen-spezifisch depletieren können. Hierzu wurden periphere mononukleäre Zellen (PBMC) isoliert und die darin enthaltenen $CD8^+$ T-Zellen mittels aAPC antigen-spezifisch expandiert (2.2.2.4). Die so erhaltenen antigen-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen wurden wöchentlich hinsichtlich ihrer Spezifität untersucht und ab einer ≥ 50 % Spezifität für das gewählte Antigen als Zielzellen in Kokulturen mit KaAPC und c.b. verwendet (**Abbildung 3**).

CMV_{pp65} spezifische $CD8^+$ T-Zellen von verschiedenen Spendern wurden sowohl mit KaAPC, beladen mit dem spezifischen CMV_{pp65}-Peptid oder mit ^{Mart-1}KaAPC bzw. unbeladen^{KaAPC}, als auch mit ^{CMVpp65}c.b., ^{Mart-1}c.b. und unbeladen^{c.b.} in T-Zell-Kokulturmedium inkubiert (**Abbildung 13, graue Balken**). Nach 48 h wurden die Anätze geerntet und die Menge der vitalen Zellen (Annexin V/PI) durch sofortige Annexin V/PI Färbung bestimmt. In Kokulturen mit ^{CMVpp65}KaAPC konnte eine starke Induktion von Apoptose beobachtet werden, da in diesen Ansätzen nur noch knapp 13 % der Zellen einen vitalen Phänotyp aufwiesen. Dagegen konnte in Kokulturen mit ^{Mart-1}KaAPC, unbeladen^{KaAPC} und c.b. kein signifikanter Verlust der CMV_{pp65} spezifischen $CD8^+$ T-Zellvitalität detektiert werden (88 – 97 % vitale Zellen), der über die Hintergrundapoptose hinausging.

Da CMV_{pp65} (NLVPMVATV) ein hoch affines Peptid ist und somit möglicherweise eine antigen-spezifischen Depletion der CMV_{pp65} spezifischen $CD8^+$ T-Zellen begünstigen würde, führten wir die selben Versuche mit Mart-1 spezifischen $CD8^+$ T-Zellen durch. Mart-1 (ELAGIGILTV) ist ein niedrig affines Peptid welches aus dem Melanozytenselbstantigen MelanA generiert ist. Mart-1 spezifischen $CD8^+$ T-Zellen unterschiedlicher Spender wurden mit c.b. (Daten nicht gezeigt) und ^{Mart-1}KaAPC, ^{CMVpp65}KaAPC und unbeladen^{KaAPC} für 48 h in T-Zell-Kokulturmedium inkubiert (**Abbildung 13, schwarze Balken**).

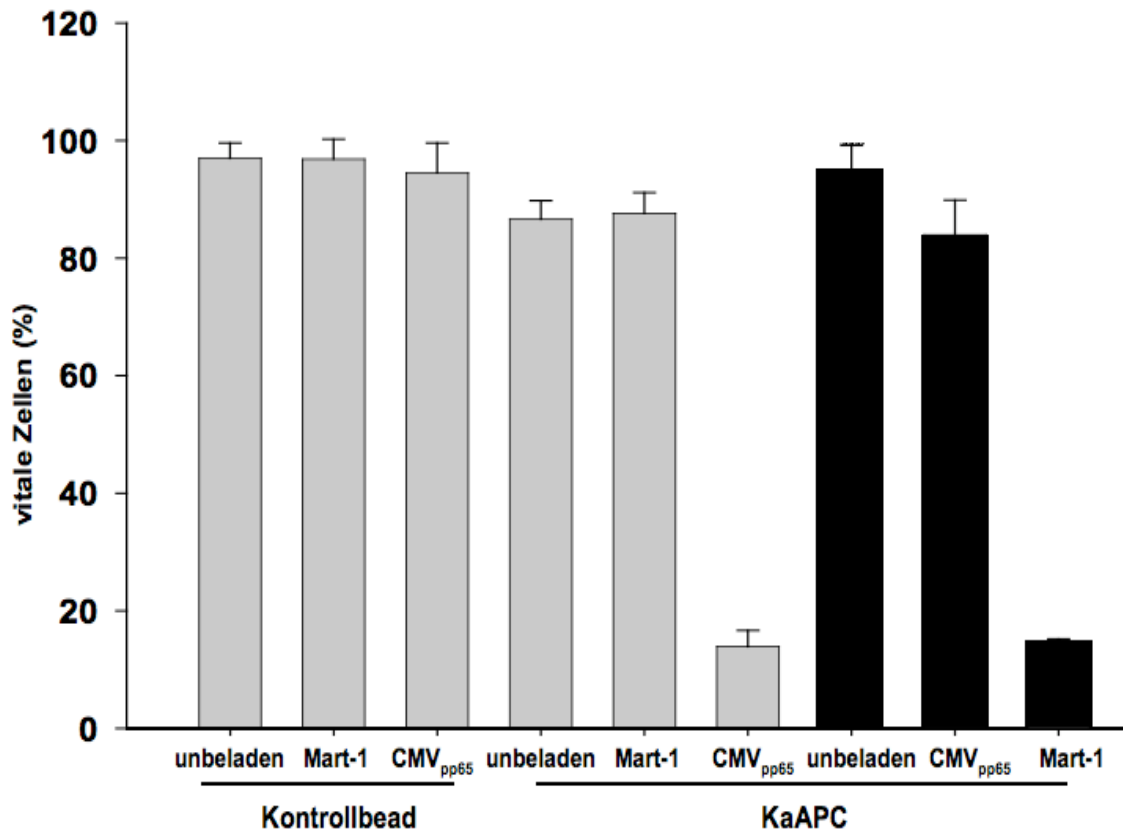


Abbildung 13:

Antigenspezifische Eliminierung von CTL nach Kokultur mit KaAPC. CMV_{pp65} spezifische CTL (hellgraue Balken) und Mart-1 spezifische CTL (schwarze Balken) wurden sowohl mit KaAPC als auch mit den entsprechenden Kontrollbeads (c.b.) kokultiviert. Die c.b. und KaAPC wurden entweder unladen oder mit Mart-1 bzw. CMV_{pp65}-Peptid beladen in den Kulturen eingesetzt. Nach 48 h wurden die einzelnen Ansätze geerntet und die T-Zellen zur Bestimmung der Apoptoserate mit Annexin V/PI gefärbt. Dargestellt ist die relative, prozentuale Vitalität (% vitale Zellen = (% behandelte, vitale Zellen x 100%)/% unbehandelte, vitale Zellen) (Mittelwert±SD).

Vergleichbar zu den Kokulturen mit CMV_{pp65} spezifischen CD8⁺ T-Zellen, kam es nur in ^{Mart-1} KaAPC Ansätzen, zur deutlichen Induktion von Apoptose (15 % vitale Zellen). Kokulturen mit ^{CMVpp65} KaAPC und ^{unladen} KaAPC zeigten hingegen nur Hintergrundapoptose. Auch die gleichzeitige Inkubation mit den verschiedenen beladenen c.b. (^{CMVpp65} c.b., ^{Mart-1} c.b., ^{unladen} c.b.) führte nur zu einer sehr leichten Reduktion der T-Zellvitalität (87 - 95 % vitale Zellen, Daten nicht gezeigt).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass KaAPC CD8⁺ T-Zellen antigenspezifisch eliminieren konnten, da nur KaAPC, die mit dem korrespondierenden Peptid beladen worden waren, zu einer deutlichen Induktion von antigenspezifischer Apoptose führten. Dabei war die beobachtete hohe Effizienz unabhängig von der Affinität des jeweiligen Peptids im

verwendeten Modellsystem. Da eine solche antigenspezifische Depletion nicht in Kokulturen mit CMV_{pp65} c.b., $Mart-1$ c.b. und $unbeladen$ c.b. nachzuweisen war, kann man davon ausgehen, dass diese ausschließlich über den auf der KaAPC-Oberflächen immobilisierten α -Fas Antikörper vermittelt wurde.

3.5.3 Die KaAPC Funktion ist abhängig vom KaAPC : CTL Verhältnis

Um die Kapazität der KaAPC hinsichtlich ihrer Apoptoseinduktion in antigenspezifischen CTL weiter zu untersuchen, wurden CMV_{pp65} spezifische $CD8^+$ T-Zellen für 48 h mit unterschiedlichen Mengen an KaAPC oder c.b. kokultiviert. Diese waren entweder unbeladen oder mit CMV_{pp65} bzw. $Mart-1$ Peptid beladen.

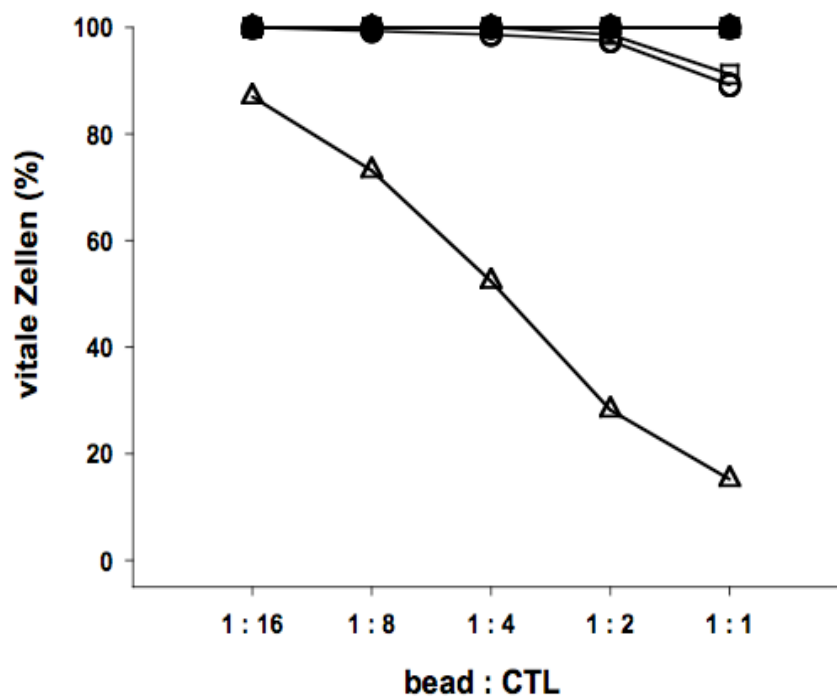


Abbildung 14:

Untersuchung des Einflusses des „bead“ : CTL Verhältnisses auf die Funktion der KaAPC. CMV_{pp65} spezifische CTL wurden kokultiviert mit unbeladenen (Kreise), $Mart-1$ (Vierecke) oder CMV_{pp65} -Peptid (Dreiecke) beladenen KaAPC (transparente Symbole) und Kontrollbeads (ausgefüllte Symbole). Dabei wurden die „bead“ : CTL Verhältnisse, wie auf der X-Achse angegeben, variiert. Nach 48 h Kokultur wurden die Ansätze geerntet und mit Annexin V/PI gefärbt. Dargestellt ist die relative, prozentuale Vitalität (% vitale Zellen = (% behandelte, vitale Zellen x 100%)/% unbehandelte, vitale Zellen).

Wie aus **Abbildung 14** ersichtlich, war die Induktion von antigenspezifischer Apoptose in CMV_{pp65} spezifischen T-Zellen durch CMV_{pp65}KaAPC (transparente Dreiecke) direkt abhängig vom gewählten „bead“ : CTL Verhältnis. Betrug die Menge an vitalen T-Zellen bei einem 1 : 16 Verhältnis noch 87 %, so nahm diese mit steigender Menge an KaAPC (1 : 8; 1 : 4; 1 : 2) in den Kokulturen stetig ab, bis diese schließlich nur noch ca. 15 % ausmachten (1:1). Gleichzeitig konnte, wie in den vorangegangenen Experimenten, keine Apoptoseinduktion in CMV_{pp65} spezifischen CD8⁺ T-Zellen detektiert werden, die über eine Hintergrundapoptose hinausging, wenn diese mit ^{unbeladen}c.b., ^{Mart-1}c.b., CMV_{pp65}c.b., ^{unbeladen}KaAPC und ^{Mart-1}KaAPC kokultiviert wurden (90 – 100 % vitale Zellen). Dabei war der Grad der Hintergrundapoptose unabhängig von der Menge der eingesetzten KaAPC bzw. c.b..

Somit ist die Effizienz der KaAPC vermittelten antigenspezifischen Eliminierung von CD8⁺ T-Zellen direkt beeinflussbar über die zur Kokultur mit den antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen eingesetzte KaAPC-Menge. Daher wurden auch alle weiteren Experimente, wie zuvor schon, mit einem „bead“ : CTL Verhältnis von 1 : 1 angesetzt.

3.5.4 Die KaAPC Funktion ist zeitabhängig

Weiterführende Kokulturexperimente sollten die Frage klären, ob für eine maximale Apoptoseinduktion in antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen auch eine kurze Interaktion der KaAPC mit den T-Zellen ausreichend war, oder ob diese für eine optimale Elimination der CD8⁺ T-Zellen mindestens 48 h betragen musste. Hierzu wurden CMV_{pp65} spezifische CD8⁺ T-Zellen mit ^{unbeladen}KaAPC, ^{Mart-1}KaAPC und CMV_{pp65}KaAPC für unterschiedliche Zeitperioden (30, 60, 120 min) kokultiviert (**Abbildung 15**). Nach Ablauf dieser Zeitspannen wurden die KaAPC mittels eines Magneten aus den Ansätzen entfernt und die T-Zellen bis zum Ablauf von vollen 48 h alleine weiter inkubiert. Lichtmikroskopische Kontrollen der Kokulturen ergaben, dass mindestens 95 % der KaAPC aus den Ansätzen entfernt werden konnten. Als Positivkontrolle diente ein Ansatz indem KaAPC und T-Zellen für die gesamten 48 h kokultiviert wurden. Nach Ablauf der 48 h wurden die Ansätze geerntet, und die Vitalität der CMV_{pp65} spezifischen CD8⁺ T-Zellen durch Annexin V/PI Färbung bestimmt.

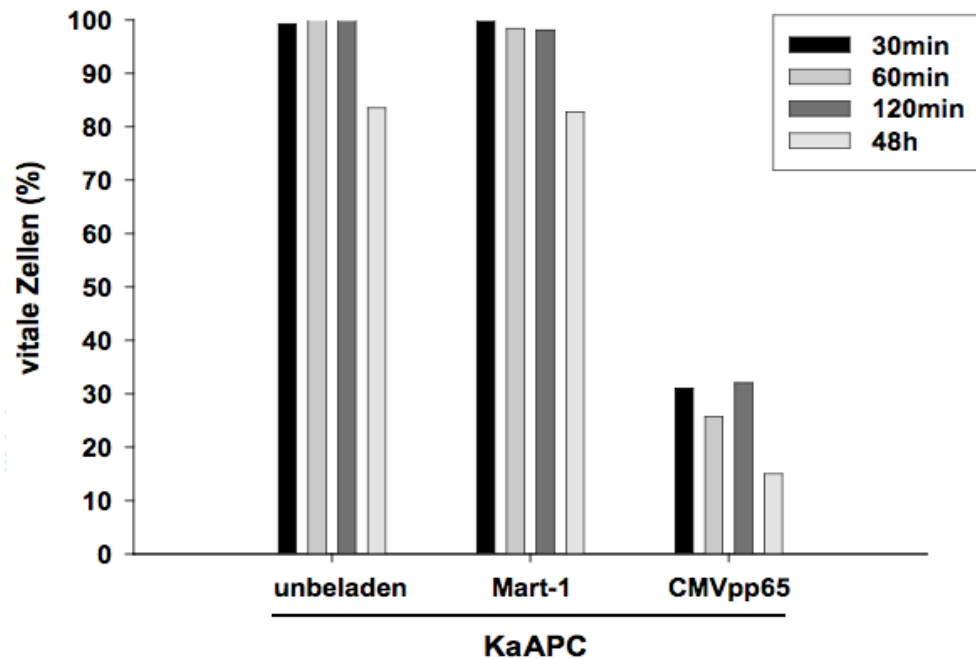


Abbildung 15:

Die Eliminierung der antigenspezifischen CTL in Kokultur mit KaAPC erfolgt schon innerhalb der ersten 30 Minuten. CMV_{pp65} spezifische CTL wurden mit unterschiedlich beladenen oder unbeladen KaAPC kokultiviert (X-Achse). Nach Ablauf der angegebenen Zeitspannen (30, 60 und 120 min) wurden die KaAPC magnetisch aus den Kokulturen entfernt und die CMV_{pp65} spezifischen CTL bis zum Ablauf von 48 h weiter inkubiert. Anschließend erfolgte eine Annexin V/PI Färbung zur Bestimmung der Apoptoseraten. Kokulturen der KaAPC mit den CMV_{pp65} spezifischen CTL über die kompletten 48 h dienten als Positivkontrolle. Dargestellt ist die relative, prozentuale Vitalität (% vitale Zellen = (% behandelte, vitale Zellen x 100%)/% unbehandelte, vitale Zellen).

Schon nach 30 min konnte in mit CMV_{pp65} KaAPC kokultivierten CMV_{pp65} spezifischen CD8⁺ T-Zellen eine nur noch 30 %-ige Vitalität detektiert werden. Dies war vergleichbar zu den nach 60 min und 120 min gemessenen Vitalitäten (27 % und 32 %) und nur unwesentlich höher als in der, über die vollen 48 h kokultivierten, Positivkontrolle (15 %). Dahingegen konnte in Kokulturen mit unbeladen KaAPC und Mart-1 KaAPC keine Abnahme der Vitalität über den normalen Hintergrund hinaus nachgewiesen werden (85 – 100 %). Gleiches traf für Kokulturen mit unbeladen c.b., Mart-1 c.b. und CMV_{pp65} c.b. zu (Daten nicht gezeigt).

Somit bewies der hier untersuchte KaAPC-Phänotyp erneut sein Potential zur antigenspezifischen Depletion von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen. Ebenso konnte gezeigt werden, dass KaAPC schon nach einer sehr kurzen Interaktionszeit (30 min) mit antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen dazu befähigt waren, in diesen antigenspezifische Apoptose zu induzieren.

3.5.5 Die KaAPC vermittelte Depletion antigenspezifischer CTL führt nicht zur Aktivierung von CTL und ist nicht TNF- α abhängig

Um den zugrunde liegenden Mechanismus der KaAPC vermittelten antigenspezifischen Apoptoseinduktion besser zu charakterisieren, untersuchten wir ob „bead“-T-Zellkontakt zur Aktivierung der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen führt. Dabei sollte näher untersucht werden, ob die beobachtete Depletion antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen ausschließlich über den auf der KaAPC-Oberfläche immobilisierten α -Fas Antikörper ausgelöst wird. Um den Aktivierungszustand der T-Zellen zu untersuchen, bestimmten wir die Menge an auf der T-Zelloberfläche exprimierten CD107a. Darüberhinaus bestimmten wir die Menge an in den Überstand sezernierten TNF- α . Für TNF- α wurde bereits gezeigt, dass es als FasL Homolog über die Bindung an den Fas Rezeptor auf aktivierten T-Zellen Apoptose induzieren kann. Dabei könnte der aktivierungsinduzierte Zelltod (AICD) sowohl durch praxine als auch autokrine TNF- α Effekte vermittelt werden.

3.5.5.1 CD107a Assay

CD107a (LAMP-1) ist beschrieben worden als ein Marker für die CD8⁺ T-Zellaktivierung. In CD8⁺ T-Zellen liegt dieser in intrazellulären Vesikeln vor. Diese verschmelzen bei einer Aktivierung der CD8⁺ T-Zelle (z.B. durch korrespondierendes Peptid oder α -CD3/28 Stimulation) mit der Plasmamembran und es kommt zu einer Expression des CD107a auf der Zelloberfläche, wo dieser Marker dann durch spezifischen Antikörper angefärbt werden kann. Ebenso konnte gezeigt werden das CD107a⁺ CD8⁺ T-Zellen, die über ihr korrespondierendes Peptid aktiviert wurden zu antigenspezifischen zytotoxischen Effektorfunktionen befähigt sind^{217,218}.

Daher untersuchten wir die Menge an oberflächenständigem CD107a auf CMV_{pp65} spezifischer, CD8⁺ T-Zellen nach 5 h Inkubation mit KaAPC und c.b.. KaAPC und c.b. wurden entweder unbeladen (Daten nicht gezeigt) oder mit Mart-1 bzw. CMV_{pp65}-Peptid beladen in die Kokulturen eingesetzt (**Abbildung 16**). Als Positivkontrolle dienten CMV_{pp65} spezifische CD8⁺ T-Zellen, die mit 7,5 ng/ml löslichem CMV_{pp65}-Peptid stimuliert wurden, was in einer Expression des CD107a auf bis zu 35 % der antigenspezifischen T-Zellen resultierte. Dahingegen konnten in Ansätzen von CMV_{pp65} spezifischen CD8⁺ T-Zellen mit CMV_{pp65}KaAPC keine CD107a⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. Somit kam es in diesen Ansätzen nicht zu einer Aktivierung der T-Zellen, jedoch zu einer substanziellen

Apoptoseinduktion in den CMV_{pp65} spezifischen CD8⁺ T-Zellen (Daten nicht gezeigt). In Kokulturen mit Mart-1 c.b., CMV_{pp65} c.b. und Mart-1 KaAPC kam es ebenfalls nicht zu einer Hochregulation der CD107a Expression auf CMV_{pp65} spezifischen CD8⁺ T-Zellen, doch konnte in diesen auch keine Induktion von antigenspezifischer Apoptose nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

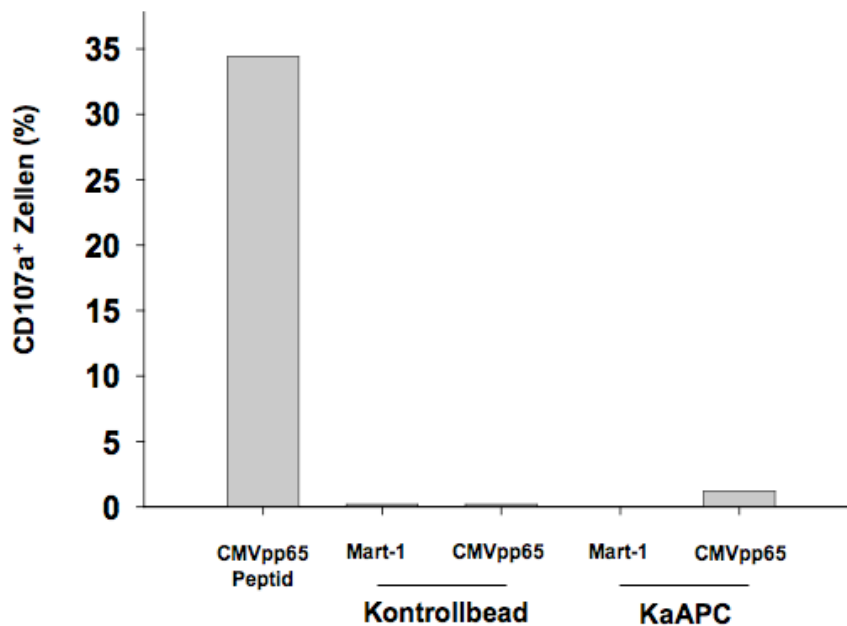


Abbildung 16: „bead“ – CTL Kontakt führt nicht zur Aktivierung der antigenspezifischen CTL. CMV_{pp65} spezifische CTL wurden mit Mart-1 oder CMV_{pp65}-Peptid beladen KaAPC und Kontrollbeads inkubiert. 7.5ng/ml lösliches CMV_{pp65}-Peptid diente als Positivkontrolle. Die Menge der CD107a positiven Zellen wurde 5 h nach Ansatz der Kokulturen durchflusszytometrisch bestimmt.

3.5.5.2 TNF- α Sekretion und Blockierung

Durch die vorangegangenen Experimente konnte demonstriert werden, dass die Kokultur von KaAPC mit antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen nicht zu deren Aktivierung führt. Jedoch bliebe als mögliche Ursache der T-Zellapoptose noch die verstärkte Sekretion von TNF- α durch die mit KaAPC in Kontakt gekommenen T-Zellen. Es ist beschrieben, dass T-Zellen schon kurz nach erfolgter TCR – HLA Interaktion TNF- α produzieren²¹⁹⁻²²¹ und dass dieser TNF- α , neben Zelldifferenzierung und Proliferation auch Zelltod auslösen kann²²²⁻²²⁴.

Daher untersuchten wir in Kokulturen mit Mart-1 spezifischen CD8⁺ T-Zellen die, durch CMV_{pp65} KaAPC, Mart-1 KaAPC, CMV_{pp65} c.b. und Mart-1 c.b. induzierte Produktion von TNF-

α (**Abbildung 17A**). Mart-1 spezifische $CD8^+$ T-Zellen wurden im Verhältnis 1 : 1 mit den auf der X-Achse angegebenen KaAPC und c.b. für 48 h kokultiviert. Anschließend wurden die Überstände asserviert und mittels der Luminex®-Technologie analysiert. Dargestellt ist die Menge an TNF- α in pg/ml Zellüberstand (Mittelwert \pm SD). 1 μ g/ml lösliches Mart-1 Peptid und α -Fas Antikörper (1 μ g/ml) dienten als Kontrollen. Konnte durch die Aktivierung der Mart-1 spezifischen $CD8^+$ T-Zellen über ihr korrespondierendes Peptid eine TNF- α Produktion von bis zu 1800 pg/ml beobachtet werden, so kam es in Kokulturen mit den KaAPC und c.b. zu keinerlei Sekretion von TNF- α . Gleichzeitig konnte jedoch eine effiziente Apoptoseinduktion in den Mart-1 spezifischen $CD8^+$ T-Zellen bei Kokultivierung mit $^{Mart-1}$ KaAPC detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Eine Inkubation der antigenspezifischen T-Zellen mit α -Fas Antikörpern führte zwar zum Verlust der Vitalität, aber nicht zu einer nachweisbaren TNF- α Produktion. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass löslicher, in den Überstand der Kokulturen sezernierter, TNF- α für die antigenspezifische Eliminierung der $CD8^+$ T-Zellen verantwortlich war.

Da TNF- α jedoch nicht nur löslich, sondern auch membranständig von T-Zellen produziert wird, untersuchten wir in Folgeexperimenten, ob möglicherweise membranständiger TNF- α Ursache für die Apoptoseinduktion in antigenspezifischen $CD8^+$ T-Zellen war (**Abbildung 17B**). Hierzu untersuchten wir die antigenspezifische Elimination von Mart-1 spezifischen $CD8^+$ T-Zellen durch $^{Mart-1}$ KaAPC in Anwesenheit von einem blockierenden α -TNF- α Antikörper oder dessen Isotypkontrolle (Maus-IgG1) und verglichen diese zu Kokulturen, unter ausschließlicher Verwendung von $^{Mart-1}$ KaAPC. Die Bestimmung der Vitalität erfolgte nach 48 h Inkubation durch Annexin V/PI Färbung. Übereinstimmend mit den vorhergehenden Ergebnissen (**Abbildung 17A**) konnte bei Gabe eines neutralisierenden α -TNF- α Antikörpers, auch in unterschiedlichen Konzentrationen (0,1, 1, 10 μ g/ml), oder dessen Isotyp (10 μ g/ml) die, durch $^{Mart-1}$ KaAPC induzierte Apoptoseinduktion in Mart-1 spezifischen $CD8^+$ T-Zellen nicht inhibieren.

Damit konnte eine Beteiligung von löslichem oder membranständigem TNF- α an der antigenspezifischen Elimination von antigenspezifischen $CD8^+$ T-Zellen vollständig ausgeschlossen werden.

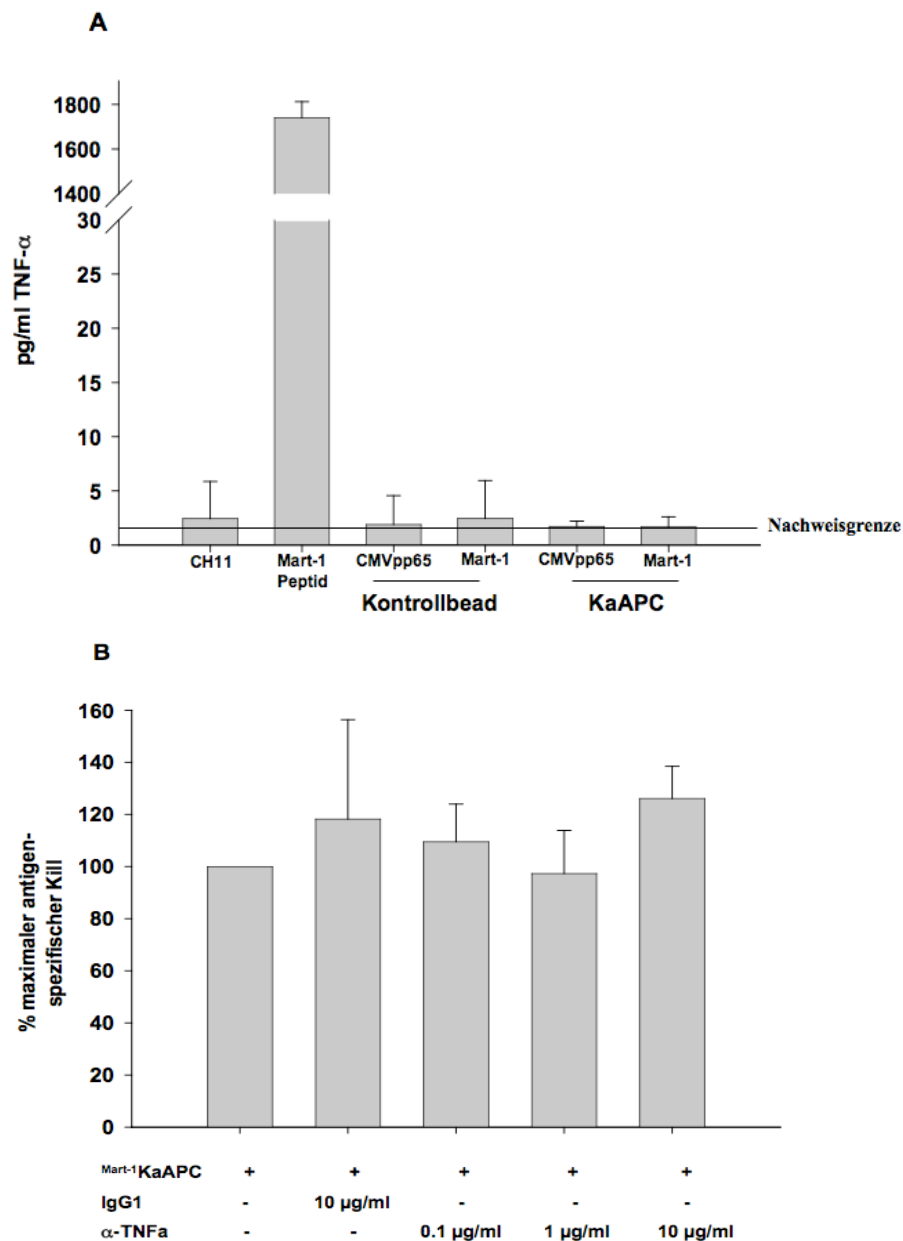


Abbildung 17:

Die in Kokulturen mit spezifisch beladenen KaAPC detektierte Eliminierung von antigenspezifischen CTL ist nicht TNF- α vermittelt. (A) Mart-1 spezifische CTL wurden mit Mart-1 oder CMV_{pp65}-Peptid beladenen KaAPC oder Kontrollbeads kokultiviert. 1 μ g/ml α -Fas Antikörper (CH11), 1 μ g/ml lösliches Mart-1 Peptid und unstimulierte CTL dienten als Kontrollen. Die Überstände wurden nach 48 h abgenommen, und die Menge an sezerniertem TNF- α bestimmt. Dargestellt ist die TNF- α Konzentration in pg/ml (pg/ml stimulierte CTL – pg/ml unstimulierte CTL) (Mittelwert \pm SD). **(B)** Mart-1 spezifische CTL wurden kokultiviert mit Mart-1 beladenen KaAPC entweder in Anwesenheit unterschiedlicher Mengen eines neutralisierenden α -TNF- α Antikörpers (0,1 ; 1 ; 10 μ g/ml) oder mit ¹²⁵I-KaAPC alleine. 10 μ g/ml IgG1 diente als Isotypkontrolle für den neutralisierenden α -TNF- α Antikörper. Die Ansätze wurden 48 h nach Beginn der Kokulturen geerntet und Annexin V/PI gefärbt. Dargestellt ist die relative antigenspezifische Apoptose in Bezug zu Mart-1 spezifischen CTL, kokultiviert mit ¹²⁵I-KaAPC (Mittelwert \pm SD).

3.5.6 KaAPC vermittelte antigenspezifische Elimination von CTL in T-Zellkulturen unterschiedlicher Antigenpezifität

3.5.6.1 Etablierung einer neuen durchflusszytometrischen Methode zur Vitalitätsbestimmung von CTL unterschiedlicher Antigenpezifität

Es wurden bereits sehr viele Methoden entwickelt, die zur Charakterisierung und Quantifizierung von antigenspezifischen $CD8^+$ T-Zellen eingesetzt wurden. Viele der älteren Methoden bedienen sich zu meist radioaktiver Reagenzien wie z.B. $^{51}\text{Chrom}$, $^{75}\text{Selen}$ und $^3\text{H-Tritium}$ ²²⁵⁻²²⁷, aber auch nicht radioaktive Substanzen wie Europium (Eu^{3+})²²⁸ oder Calcein-AM²²⁹ wurden zur Analyse induzierter Apoptose in T-Zellen verwendet. Jedoch haben alle diese Methoden den Nachteil einer geringen Präzision, da sie davon abhängen, dass die verwendeten Substanzen in den Kulturüberstand sezerniert werden müssen. Durch die Verwendung der Durchflusszytometrie als zentrales Analyseverfahren erlauben neuere Methoden die genaue Analyse von Einzelzellen hinsichtlich phänotypischer und funktioneller Parameter²³⁰⁻²³⁴. Viele dieser neuen Ansätze bedienen sich eines oder mehrerer Membranfarbstoffe wie z.B. PKH zur Differenzierung der eingesetzten Effektor- oder Zielzellen²³¹⁻²³⁸. Da es sich dabei um sehr stabile und nicht toxische Zellfarbstoffe handelt, konnten dieser sehr gut für Proliferations- und Apoptosestudien eingesetzt werden. Jedoch alle bis jetzt publizierten Ansätze eigneten sich nicht zum Nachweis der KaAPC vermittelten antigenspezifischen Elimination antigenspezifischer $CD8^+$ T-Zellen aus T-Zellkulturen unterschiedlicher Antigenpezifität. Daher entstand die Notwendigkeit der Entwicklung und Evaluierung eines dazu geeigneten Verfahrens auf der Basis der bisher bekannten Methoden. In dem neu entwickelten Analyseverfahren bedienen wir uns der beiden Zellmembranfarbstoffe PKH67 (grün) und PKH26 (rot). Diese beiden Farbstoffe wurden eingesetzt um die T-Zellpopulationen verschiedener Antigenpezifitäten voneinander eindeutig zu unterscheiden. Um eine populationsbezogene Bestimmung der Apoptoserate zu ermöglichen, wurde zusätzlich eine Färbung mit Annexin V und 7-AAD durchgeführt. Zur Bearbeitung der einzelnen Fragestellungen wurden PKH67 oder PKH26 markierte (2.2.3.2.4) T-Zellpopulationen, im Verhältnis 1 : 1 gemischt (T-Zellmischkultur; T_{mix}). Je $1,5 \times 10^5$ Zellen der T_{mix} well wurden anschließend auf eine 96-well Rundbodenplatte ausgebracht und mit unterschiedlichen Stimuli für 45 - 48 h stimuliert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die einzelnen Ansätze sofort geerntet und es wurde mittels Durchflusszytometrie die Apoptoserate bestimmt.

Eine spezielle Auswertestrategie (**Abbildung 18**) erlaubte uns, die Apoptoserate jeder einzelnen CTL-Population gleichzeitig aus einem Ansatz zu ermitteln. Hierzu wurden die T_{mix} initial hinsichtlich morphologischer Kriterien anhand des Vorwärts- (FSC) und des Seitwärtsstreulichts (SSC) ausgewertet. Das erlaubte den Ausschluß von Zellbruchstücken und apoptotischen Vesikeln. Anschließend wurde die T_{mix} in einer Zweiparameterdarstellung aufgetrennt in die PKH67⁺ T-Zellpopulation A und die PKH26⁺ T-Zellpopulation B. Jede dieser beiden T-Zellpopulationen wurde dann erneut in einer weiteren Zweiparameterdarstellung hinsichtlich ihrer Positivität für die beiden Apoptosefarbstoffe Annexin V und 7-AAD untersucht. Dank dieses speziellen Analyseverfahrens war es möglich in beiden T-Zellpopulationen getrennt aber gleichzeitig die Vitalität zu bestimmen. Die in **Abbildung 18** zum Vergleich dargestellte Vitalität der gesamten T_{mix} (PKH67/PKH26) verdeutlicht, dass erst die getrennte Betrachtung der einzelnen T-Zellpopulationen ein reales Abbild der Apoptoseverhältnisse in den unterschiedlichen Ansätzen erlaubt.

Die Verlässlichkeit der durch diese Kombination von Farbstoffen erhaltenen Daten wurde zuvor gründlich evaluiert. So konnte sowohl in Wildtyp Jurkatzellen und in Caspase-8 defizienten Jurkatzellen gezeigt werden, dass die, durch α -Fas Antikörper induzierten Apoptoseraten in der T_{mix} absolut identisch waren mit denen, die in den Einzelkulturen der jeweiligen Jurkatzellen bestimmt werden konnten. Weiterführende Experimente mit humanen primären naiven- und aktivierten-CTL ergaben ebenfalls identische Apoptoseraten für die T_{mix} und die jeweiligen Einzelkulturen. Auch konnte gezeigt werden, dass die Bestimmung einer bidirektionalen Apoptoseinduktion in T_{mix} von T-Zellen unterschiedlicher HLA-Phänotypen möglich war. Die Etablierung und Evaluierung dieser neuen Nachweismethode wurde in einer weiteren Arbeit zusammengefasst und publiziert (Publikationsverzeichnis, Veröffentlichung 1).

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Analysemethode erlaubte somit den verlässlichen Nachweis antigenspezifischer Eliminierung von antigenspezifischen CD8⁺ CTL aus T-Zellmischungen unterschiedlicher Antigenpezifität.

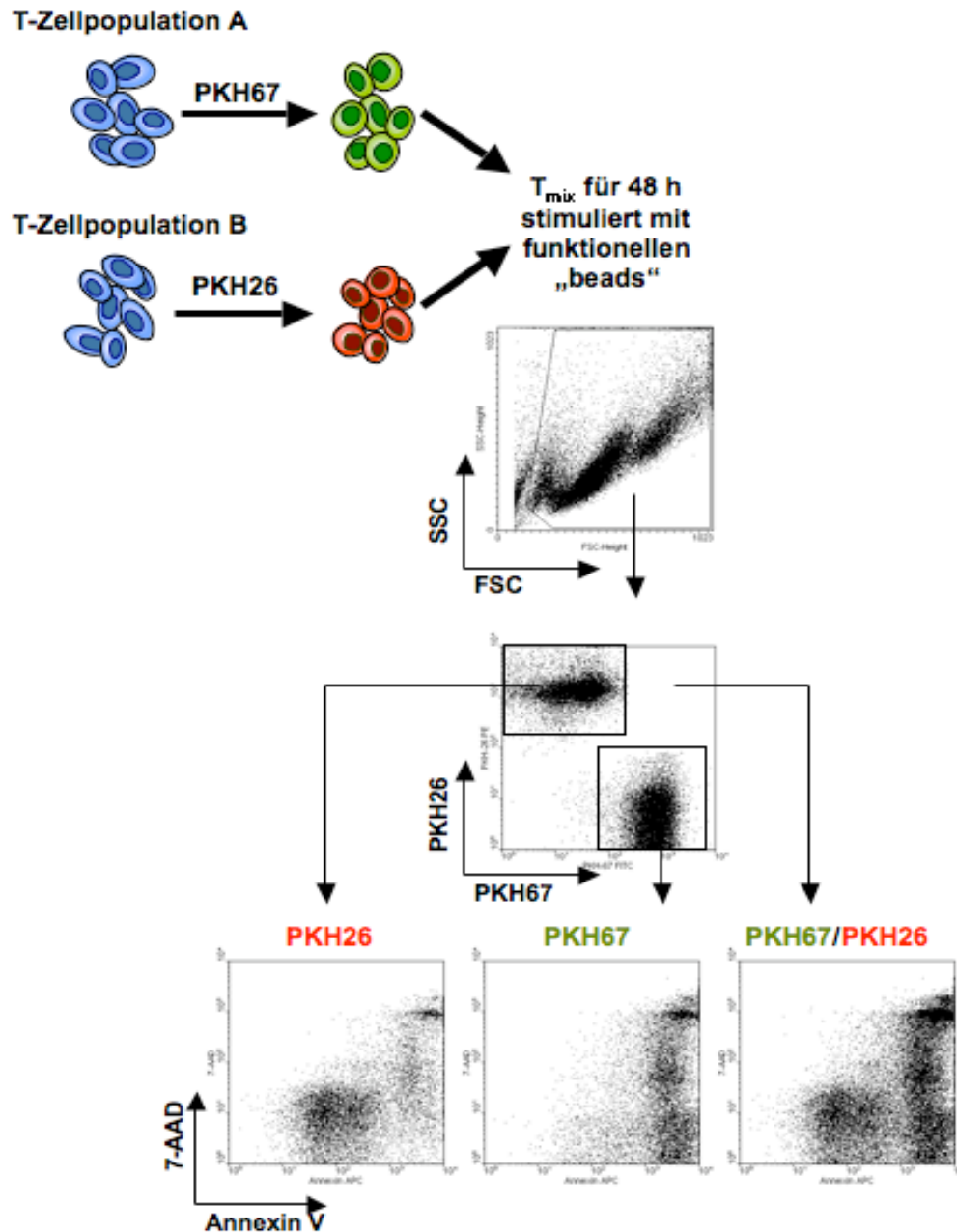


Abbildung 18: Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs und der Auswertestrategie eines PKH67/26 Assays. Zwei T-Zellpopulationen unterschiedlicher Antigenspezifität (T_A und T_B) wurden entweder mit PKH26 oder PKH67 gefärbt und in einem Verhältnis von 1 : 1 gemischt. Nach Kokultur mit unterschiedlichen Stimuli wurden die T-Zellen erst in Abhängigkeit von ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) dargestellt. Anschließend wurden die unterschiedlichen T-Zellpopulationen (T_A und T_B) anhand ihrer PKH Färbung identifiziert und diese hinsichtlich ihrer Färbung mit Annexin V und 7-AAD weiter untersucht. Dies ermöglichte die getrennte und gleichzeitige Analyse der apoptotischen Zellen in den unterschiedlichen T-Zellpopulationen.

3.5.6.2 Formaler Nachweis der KaAPC vermittelten antigenspezifischen Depletion von CD8⁺ T-Zellen aus T-Zellmischkulturen unterschiedlicher Antigenpezifität

Um formal zu demonstrieren, dass KaAPC CD8⁺ T-Zellen antigenspezifisch eliminieren, führten wir Kokulturrexperimente unter Verwendung einer T-Zellmischkultur (T_{mix}) aus antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen unterschiedlicher Antigenpezifität durch. Hierzu wurde eine autologe T_{mix} hergestellt aus PKH67 gefärbten, CMV_{pp65} spezifischen CD8⁺ T-Zellen und PKH26 gefärbten, aktivierten, Fas⁺ CD8⁺ Effektor-Memory-T-Zellen im Verhältnis 1 : 1. Die Zellen dieses T_{mix} wurden dann kokultiviert mit unbeladenen oder CMV_{pp65}-Peptid beladenen KaAPC. Dieser Versuchsaufbau erlaubte uns eine gleichzeitige und unabhängige Evaluierung der Apoptoseinduktion in beiden T-Zellkulturen des T_{mix}. Hierzu bestimmten wir die Apoptose über differentielles Auswerten der PKH67⁺ und PKH26⁺ CD8⁺ T-Zellen (3.5.6.1).

Abbildung 19 zeigt klare Unterschiede in beiden T-Zellpopulationen nach Inkubation mit CMV_{pp65}KaAPC. CMV_{pp65}KaAPC führten zu einer deutlichen Apoptoseinduktion in den PKH67⁺ CMV_{pp65} spezifischen CD8⁺ T-Zellen (graue Blaken). Nur 14 % dieser T-Zellen wiesen nach 48 h einen vitalen Phänotyp auf. Dahingegen führte eine Kokultur mit CMV_{pp65}KaAPC in der PKH26⁺, aktivierten, Fas⁺ CD8⁺ Effektor-Memory-T-Zellepopulation nicht zu einer spezifischen Apoptoseinduktion. In dieser Population verblieben über 70 % vitale Zellen. Ebenso kam es in den Kokulturen mit ^{unbeladen}KaAPC (85 – 97 % vitale Zellen) oder anderen c.b. (Daten nicht gezeigt) zu keiner signifikanten Depletion von CD8⁺ T-Zellen.

Ausgehend von der Tatsache, dass beide T-Zellpopulationen eine sehr hohe Apoptosesensitivität besaßen, während sie mit löslichem α-Fas Antikörper behandelt wurden (ca. 10 % vitale Zellen), ließen diese Ergebnisse darauf schließen, dass die gefundenen Apoptoseunterschiede der beiden T-Zellpopulationen ihre Ursache in der spezifischen Interaktion von CMV_{pp65}KaAPC mit CMV_{pp65} spezifischen CD8⁺ T-Zellen hatten.

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass KaAPC antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen aus einer Mischung aktivierter T-Zellen unterschiedlicher Antigenpezifität antigenspezifisch depletieren können.

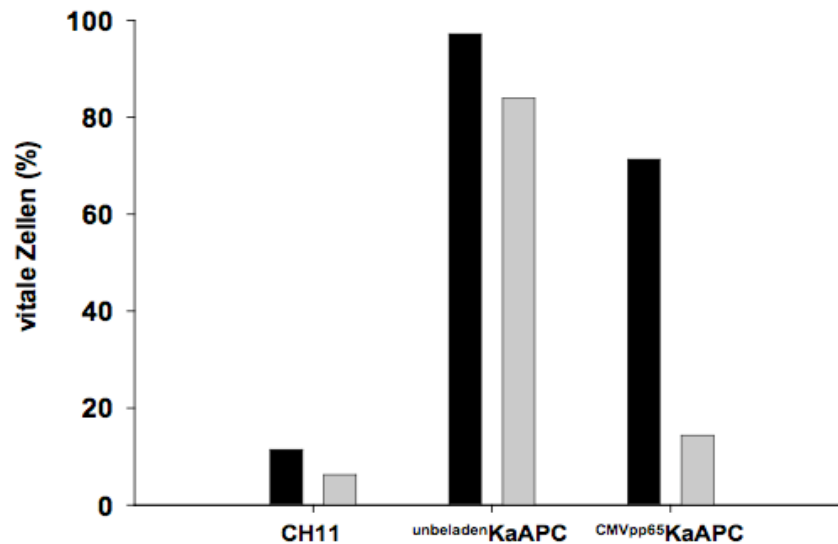


Abbildung 19:

KaAPC depletieren CTL aus einem heterogenen Gemisch unterschiedlicher Antigen-spezifitäten. PKH26 gefärbte, aktivierte Fas⁺ Effektor CTL (schwarze Balken) und PKH67 gefärbte CMV_{pp65} spezifische CTL (graue Balken) desselben Spenders wurden im Verhältnis 1 : 1 gemischt und mit unbeladenen KaAPC oder CMV_{pp65} KaAPC für 48 h kokultiviert. Kokulturen mit 1 µg/ml löslichem α-Fas Antikörper (CH11) dienten als Positivkontrolle und unbehandelte CTL-Mixkulturen als Negativkontrolle. Dargestellt ist die relative, prozentuale Vitalität der T-Zellen (% vitale Zellen = (% behandelte, vitale Zellen x 100%)/% unbehandelte, vitale Zellen).

4. Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich das Konzept des „Dritten Signals“ in seiner Anwendung mit einer KaAPC hervorragend zur Fas/FasL vermittelten, antigenspezifischen Elimination von CD8⁺ T-Zellen einsetzen lässt. Eine antigenspezifische Depletion von CD8⁺ T-Zellen durch FasL-exprimierende-APC konnte zuvor schon von verschiedenen Gruppen demonstriert werden. Sowohl in murinen und humanen *in vitro*, als auch in murinen *in vivo* Modellen konnten Ergebnisse erzielt werden, die hoffen lassen, dass diese Strategie zur Behandlung von Transplantatabstoßungsreaktionen^{163,167,169}, Autoimmunkrankheiten^{173,176-180} und chronischen Infektionskrankheiten^{164,181} eingesetzt werden kann.

4.1 Depletion antigenspezifischer CTL durch FasL-exprimierende-APC

Bei allen Erfolgen haben die meisten dieser Ansätze gravierende Nachteile aufgrund ihrer zellulären Natur, die einen klinischen Einsatz auf lange Sicht als nicht möglich erscheinen lassen. So stellt die Gewinnung des Zellmaterials ein teilweise nicht lösbares Problem dar. Die Isolierung, Anreicherung und Ausdifferenzierung von DC ist zeit-, kosten- und arbeitsintensiv. Da die Patienten in fast allen Fällen mit immunsuppressiven Medikamenten behandelt werden bzw. sich einer Chemotherapie unterziehen, ist die mehrmalige Anreicherung von PBMC aus peripherem Blut zumeist nicht möglich. Somit sind die zur Verfügung stehenden Zellmengen beschränkt und die Qualität der ausdifferenzierten DC, auf Grund der allgemeinen Immunsuppression der Spender, hoch variabel. Deshalb lässt sich ein konstanter DC-Phänotyp zur eventuellen Behandlung von Immundefekten nicht zweifelsfrei sicherstellen. Überdies konnte gezeigt werden, dass Tumore sowohl die Menge der DC-Vorläuferzellen als auch deren Funktion beeinflussen²³⁹⁻²⁴¹. Eine Dysregulation des Immunsystems ist auch Ursache von Autoimmunerkrankungen, weshalb bei Verwendung dieser Zellen weitere Probleme auftreten könnten. Darüber hinaus, ist zur Generierung von FasL-exprimierenden-APC eine Transduktion des jeweiligen Zelltyps mit dem FasL Gen notwendig. Hierzu wurden bislang sowohl virusbasierte und virusunabhängige Methoden angewandt. Eine Transduktion von APC mit für FasL kodierenden viralen Vektoren birgt bei unzureichender Effizienz die Gefahr der Initiierung einer sekundären Immunantwort gegen die viralen Antigene des Vektors, da diese von den APC prozessiert und präsentiert werden. Andererseits könnte eine hinreichende Effizienz der Transduktion zur ungewollten

Eliminierung einer protektiven Immunantwort führen, in dem die für den Vektor spezifischen, CD8⁺ T-Zellen depletiert werden würden. Ausschlaggebend für den Erfolg einer solchen Behandlung die Transduktionseffizienz der jeweiligen APC. Da diese sowohl unter Verwendung viraler als auch nicht viraler Methoden sehr stark schwankt, ist eine gleichbleibend hohe Expression des FasL auf der APC nicht sicherzustellen. Daher ließe sich auch ein entsprechender Behandlungserfolg nicht sicher voraussagen, und überdies wären die sekundären Effekte auf das Immunsystem nicht absehbar. Ein weiterer Nachteil des FasL-exprimierenden-APC Konzeptes besteht darin, dass FasL von der Zelloberfläche durch Metalloproteinasen freigesetzt werden kann und somit in das extrazelluläre Milieu sezerniert wird. Dies kann dann durch die Blockade des Fas/FasL-Signalweges und der allgemeinen Verminderung der FasL Expression zur Behinderung einer effizienten Depletion von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen führen^{170,182}. Überdies könnte es durch fehlende oder unzureichende FasL Expression auf den APC zur Impfung des Organismus mit den auto- bzw. alloreaktiven Antigenen kommen. Somit würden die zur Stimulation von T-Zellen bestens ausgestatteten APC eher eine Verstärkung der verschiedenen pathogenen Immundefekte verursachen als zu deren Linderung beitragen. Nicht zuletzt sind zelluläre Systeme sensitiv gegenüber den zytotoxischen Effektorfunktionen der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen, was zur Reduktion der Gesamtzellzahl FasL-exprimierender-APC führt¹⁸³.

4.2 Die artifizielle-antigenpräsentierende Zelle (aAPC)

Um die Nachteile der zellbasierten immunmodulatorischen Behandlungsansätze zu umgehen, konzentriert man sich seit geraumer Zeit auf die Entwicklung sogenannter artifizieller APC (aAPC), die nicht den oben geschilderten Limitationen unterliegen. aAPC finden heutzutage Anwendung vor allem bei der Generierung von antigenspezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, zur adoptiven Immuntherapie chronischer Infektionen und von Tumoren. Das Ziel dieses Verfahrens liegt in der *ex vivo* Stimulation, und der Aktivierung sowie Expansion von autologen T-Zellen über einen kurzen Zeitraum hinweg, welche anschließend wieder dem sich in Behandlung befindlichen Spender reappliziert werden.

In einem der ersten unspezifischen Ansätze konnte gezeigt werden, dass mittels α -CD3/CD28 beschichteter magnetischer „beads“ CD4⁺ T-Zellen effektiv expandiert werden konnten. Jedoch war eine Langzeitstimulation von CD8⁺ T-Zellen nicht möglich²⁴². Ebenso führte eine 1 - 2 wöchige Stimulation antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen mit α -CD3 „beads“ zum Verlust der Antigenpezifität. Dieser Effekt war auch unter Gabe von TCGF oder IL-2 nicht

umkehrbar²¹⁰. Später konnten andere Arbeitsgruppen zeigen, dass für den Erfolg einer Expansion antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen mittels α -CD3/CD28 magnetischer „beads“ das Verhältnis von α -CD3 zu α -CD28 Antikörpern ausschlaggebend war. Hierbei stellte sich heraus, dass eine zunehmende Menge an α -CD28 Antikörpern relativ zur Menge des gebundenen α -CD3 Antikörpers die Proliferation von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen begünstigte¹⁹². Überdies konnte unter Verwendung von liposomal gebundenen α -CD3, α -CD28 und α -LFA-1 Antikörpern eine effektive Expansion von polyklonalen und Mart-1 spezifischen CD8⁺ T-Zellen erreicht werden. Dabei wurde keine Abnahme der Spezifität der Mart-1 spezifischen CD8⁺ T-Zellen während der *ex vivo* Kultur beobachtet²⁰⁴.

Neben den unspezifischen Ansätzen wurden unter Verwendung von HLA-Klasse-I- und-II-Molekülen weitere spezifische aAPC entwickelt. Prakken et al. konnten ovalbuminspezifische murine T-Zellen aktivieren und expandieren, indem sie lösliche MHC-Klasse-II-Moleküle auf Liposomen immobilisierten und diese zur Stimulation verwandten. Dabei konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, dass die MHC-Moleküle sich frei in der Liposomenmembran bewegten, was der künstlichen Generierung einer funktionellen immunologischen Synapse entgegenkam¹⁸⁵. Durch die Bindung von MHC-Klasse-I-, B7.1- und B7.2-Molekülen auf der Oberfläche von Latexmikrosphären konnten im transgenen Maussystem eine Stimulation von peptidspezifischen T-Zellen erreichen werden²⁰¹. Auch im humanen, Influenza spezifischem T-Zellsystem konnte die Induktion von Effektorfunktionen gezeigt werden. Hierzu wurden magnetische „beads“ mit HLA-Molekülen und α -CD28 Antikörpern beschichtet und zur Stimulation von T-Zellen eingesetzt. Eine effektive Expansion der antigenspezifischen T-Zellen konnte in diesen Untersuchungen jedoch nicht gezeigt werden¹⁹⁸. Schilbach et al erweiterten diesen Ansatz und beschichteten „beads“ mit α -CD28 Antikörpern und unterschiedlichen Mengen an HLA-Klasse-I-Molekülen (10 nM und 100 pM). In diesen Arbeiten konnten Nebenhistokompatibilitätsantigen (mHAg) reaktive CD8⁺ T-Zellen generiert werden. Jedoch wiesen CD8⁺ T-Zellen, welche mit 100 pM aAPC generiert wurden, eine höhere lytische Aktivität auf und produzierten auch mehr IFN- γ nach Stimulation mit LCL721 Zellen als mit 10 nM aAPC generierte CD8⁺ T-Zellen²⁴³. Zuvor konnte jedoch schon mittels HLA-A₂-Ig Dimer (**Abbildung 6**) und α -CD28 Antikörper beschichteter magnetischer „beads“ die Generierung von Mart-1 und CMV_{pp65} spezifischen humanen CD8⁺ T-Zellen erreicht werden. Dabei wurden die unterschiedlichen Antigenpezifitäten durch die Beladung des HLA-A₂-Ig Dimer Moleküls mit dem jeweiligen Peptid erzeugt. Die so generierten CTL lysierten mit korrespondierendem Peptid beladene T2 Zellen, HLA-A₂⁺ Mart-1⁺

Melanomzelllinien und mit korrespondierendem Protein transfizierte A293 Zellen. Ebenso war sowohl die Expansion, als auch die Spezifität der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen vergleichbar und in einigen Fällen sogar besser als die, in klassischen, mit Peptid beladenen DC stimulierten Ansätzen²¹⁰.

Doch die hervorstechendste Eigenschaft der beschriebenen aAPC liegt in deren Vorteilen gegenüber den zellbasierten Systemen zur Depletion von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen. Sie sind im Gegensatz zur zeitaufwändigen Generierung von APC einfach und unter geringen Kosten herstellbar. Die Signalstärken und -zusammensetzungen auf diesen aAPC sind sehr gut kontrollierbar und standardisierbar und machen somit reproduzierbare Behandlungserfolge möglich. Ebenso besitzen sie eine sehr lange Haltbarkeit und könnten ohne noch längere Konservierungsphasen unmittelbar zur Behandlung eingesetzt werden. Auch ist Ihre Qualität nicht abhängig vom individuellen Zustand des Patienten, wie es bei der Gewinnung von APC der Fall ist. Auf die Verwendung autologer Zellen kann zu Gunsten eines Systems verzichtet werden, welches durch die unterschiedliche Beladung mit verschiedensten Peptiden ganz genau an die individuellen Bedürfnisse der einzelnen Patienten angepasst werden kann. Zwar sind humane HLA-Klasse-I aAPC fast ausschließlich nur mit HLA-A₂ Molekülen generiert worden, doch die hohe Prävalenz dieses HLA-Moleküls im kaukasischen Bevölkerungsanteil von 40 – 50 % verspricht eine mögliche Behandlung von fast 50 % der Bevölkerung unter Verwendung nur eines möglichen aAPC Phänotyps. Diese an sich schon hohe Effizienz wird noch dadurch erhöht, dass die einzelnen HLA-A₂ Moleküle noch zusätzlich mit unterschiedlichen krankheitsrelevanten HLA-A₂ restringierten Peptiden beladen werden können. Auch besteht prinzipiell die Möglichkeit andere HLA Moleküle einzusetzen, was in Summe die Behandlung von verschiedenen Krankheiten bei unterschiedlichen Patienten ermöglichen würde. Die Tatsache, dass aAPC immer nur das jeweilige, exogen, geladene Antigen präsentieren, macht diese zu einer sehr gut kontrollierbaren und reproduzierbaren therapeutischen Plattform. Auch die potentielle Flexibilität der „bead“- und Liposomenplattformen erlaubt die Variation der Signale in ihrer Art und Menge und nicht zu letzt sind aAPC nicht sensitiv gegenüber etwaiger zytotoxischer Effektorfunktionen von CTL.

Trotz dieses vielversprechenden Potentials der aAPC Technologie, gibt es bis zum jetzigen Zeitpunkt keinerlei klinische Studien, die die Effizienz von aAPC generierten antigen- oder tumorspezifischen CTL zur adoptiven Behandlung von malignen Tumoren *in vivo* evaluiert

haben. Hinweise darauf, dass diese Behandlungsmethode für zumindest einige Tumorerkrankungen in den nächsten Jahren eine vielversprechende Möglichkeit darstellt, geben klinische Phase I Studien mit autologen DC generierten antigenspezifischen CTL. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass CTL, spezifisch für Mart-1, gp100 oder auch Epstein Barr Virus Antigenen nach erfolgreichem adoptiven Transfer den Krankheitsverlauf von Melanom- und Hodgkinpatienten in der Mehrzahl der Fälle positiv beeinflussen konnten und sogar zur Reduktion der Tumorlast führten. Jedoch gab es neben diesen Erfolgen auch eine signifikante Anzahl an Patienten, die nicht auf eine solche Behandlung ansprachen, oder bei denen nach kurzer Regression das Tumorstadium wieder einsetzte²⁴⁴⁻²⁴⁷. Es bleibt abzuwarten, ob durch den Einsatz der aAPC Technologie diese Erfolge noch weiter verbessert werden können. Auf jeden Fall jedoch würden durch den Wegfall bzw. die Verminderung der Zellmateriallimitation die Behandlungspläne variabler und nachhaltiger gestaltet werden können.

Erste Hinweise auf die therapeutische Effizienz von aAPC generierten CTL geben *in vivo* Studien. So konnte vor kurzem gezeigt werden, dass TRP2₁₈₀₋₁₈₈ („*tyrosinase-related protein 2*“) spezifische murine CTL nach adoptiven T-Zelltransfer zur deutlichen Verringerung von 3 Tage alten Lungenmetastasen bei B6-Mäusen führten (>200 Metastasen/ 35.6 Metastasen). Ebenso waren die durch multiple Stimulationen mit TRP2₁₈₀₋₁₈₈ beladenen H-2K^b-Ig/CD83/CD28/4-1BBL-aAPC generierten CTL dazu in der Lage, das Überleben von Mäusen mit subkutanen B16 Tumoren signifikant zu verlängern (27 d/ 100% >60 d)²⁴⁸. Darüberhinaus konnte in einer weiteren Arbeit gezeigt werden, dass auch humane mit aAPC generierte²¹⁰ tumorspezifische CTL im humanen SCID-Maus-Melanommodell das Tumorstadium verhindern oder auch bereits etablierte Tumore in Regression bringen konnten. Ebenso konnte gezeigt werden, dass aAPC generierte tumorspezifische CTL bis zu 15 Tage nach erfolgreichem adoptiven Transfer im peripheren Blut nachweisbar waren und schon nach 3 Tagen antigenabhängig zu den entsprechenden Tumorstadien wanderten²⁴⁹.

Zusammengefasst sind diese Daten Belege für die potentielle klinische Verwendbarkeit von aAPC generierten tumor- und antigenspezifischen CTL zur Behandlung von Tumorerkrankungen oder chronischen Infektionen.

4.3 Die KaAPC-Plattformtechnologie

4.3.1 Prinzip der KaAPC und Optimierung der Versuchsbedingungen

Es war Ziel dieser Arbeit, eine Killer-artifizielle-antigenpräsentierende Zelle (KaAPC) herzustellen, welche die Vorzüge des Fas/FasL-Systems mit denen der aAPC verband. Dazu wurde HLA-A₂-Ig Dimer Moleküle und α -Fas Antikörper auf paramagnetischen Epoxybeads immobilisiert. Die Antigenspezifität der KaAPC wurde gewährleistet über die exogene Beladung der HLA-A₂-Ig Dimer Moleküle mit HLA-A₂ restringierten Peptiden (Mart-1; CMV_{pp65}). Ein KaAPC-Phänotyp, der eine maximale, antigenspezifische Depletion von CD8⁺ T-Zellen, bei einer gleichzeitigen minimalen CD8⁺ T-Zellaktivierung aufwies als ideal definiert.

Da zur Evaluierung eines funktionellen KaAPC-Phänotyps *in vitro* die Vitalität von Mart-1 und CMV_{pp65} spezifischen CD8⁺ T-Zellen mittels Annexin V/PI Färbung untersucht werden sollte, war es zu Beginn der Versuche von äußerster Wichtigkeit, die Kulturbedingungen dahingehend zu optimieren, dass die unstimulierten, antigenspezifischen T-Zellkontrollkulturen eine minimale Hintergrundapoptose aufwiesen. Es zeigte sich, dass die Substitution des Mediums mit TCGF unter Verwendung von 3 % humanem AB-Serum optimale Vitalitätsraten der Kontrollkulturen sicherstellte. Ebenso konnten die apoptoseinduzierenden Effekte freien Peptids durch eine Optimierung des Beladungsprotokolls und durch die Einführung von optimierten Waschschritten minimiert werden. Dies war nötig, da CD8⁺ T-Zellen exogenes Peptid auf ihre eigenen HLA-Moleküle laden und sich gegenseitig oder auch selbst präsentieren können. T-Zellautoapoptose hätte dann die Ergebnisse der KaAPC Kokulturen verfälscht^{215,216}.

Um einen idealen, funktionellen KaAPC-Phänotyp zu ermitteln, war es notwendig, sowohl das antigenspezifische als auch das apoptoseinduzierende Signal auf den „beads“ zu titrieren. Wir fanden, dass bei ansteigenden Mengen an HLA-A₂-Ig Dimer Molekülen auf der Oberfläche von KaAPC, bei einer gleichbleibenden Menge an α -Fas Antikörper (2 μ g), zunehmend mehr T-Zellen aktiviert und zur Expansion angeregt wurden. Dies führte konsequenter Weise zu einer erhöhten Vitalität dieser T-Zellkulturen, wohingegen Kokulturen mit KaAPC, die mit geringeren Mengen an HLA-A₂-Ig Dimer Molekülen beschichtet waren, geringere Vitalitätsraten aufwiesen. Wurden KaAPC mit einer optimalen Menge an HLA-A₂-

Ig Dimer Molekülen (0,01 µg) mit ansteigenden Mengen von α -Fas Antikörpern beschichtet, so konnte man eine mit zunehmender Konzentration des α -Fas Antikörpers abnehmende Vitalität in den T-Zellkulturen detektieren. Jedoch ging bei sehr hohen Konzentrationen die Antigenspezifität der KaAPC vermittelten Apoptoseinduktion verloren, und die Präsentation von α -Fas Antikörpern führte zur unspezifischen Depletion von aktivierten CD8⁺ T-Zellen.

Auf die zusätzliche Immobilisierung von kostimulierenden Signalen auf der KaAPC wurde abgesehen, da initiale T-Zellkokulturrexperimente mit α -CD28 Antikörpern beschichteten c.b. belegen konnten, dass diese zur effizienten Aktivierung der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen und damit verbundenem aktivierungsinduzierten Zelltod (AICD) führten.

4.3.2 Funktionelle Charakteristika des optimalen KaAPC-Phänotyps

Die phänotypische und funktionelle Charakterisierung des ermittelten idealen KaAPC-Phänotyps demonstrierte eindeutig die antigenspezifische Depletion von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen durch KaAPC, die mit korrespondierendem Peptid beladenen worden waren.

Dabei führte die Stimulation von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen mit KaAPC oder c.b. in keinem Fall zur Aktivierung dieser Zellen. Es konnte weder ein Anstieg der CD107a Expression auf den CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen^{217,250}, noch konnte die Produktion von signifikanten Mengen an Zytokinen beobachtet werden (**Abbildung 17A**, Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus konnte eine mögliche TNF- α vermittelte Apoptoseinduktion in KaAPC CD8⁺ T-Zellkokulturen ausgeschlossen werden²⁵¹. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Höhe der induzierten Apoptose proportional zur eingesetzten Menge an KaAPC war und schon 30 min Kokultur ausreichend waren, um in antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen Fas vermittelte Apoptose zu induzieren. Es bleibt zu vermuten, dass auch ein noch kürzeres Kokulturrintervall ausreichen würde um effizient Apoptose in den entsprechenden Zielzellen zu induzieren, jedoch war es aus versuchstechnischen Gründen nicht möglich dies weiter zu untersuchen.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass KaAPC gezielt korrespondierende, antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen aus einer Mischung von CD8⁺ T-Zellen mit unterschiedlicher Antigenspezifität depletieren. Gleichzeitig wurde in den CD8⁺ T-Zellen mit nicht relevanten Antigenspezifitäten keine signifikante Vitalitätsreduktion detektiert. In Summe zeigten diese Experimente, dass die in antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen ausgelöste Apoptose eindeutig abhängig war von einem kombinierten Signal über den TCR und Fas.

Diese beiden Signale konnten zudem nur von mit korrespondierendem Peptid beladenen KaAPC dargeboten werden. Bei mit irrelevanten Peptid beladenen KaAPC oder bei c.b. kam es nicht zur Ausbildung dieser beiden Signale. Auch war zu beobachten, dass KaAPC, die sowohl über den TCR als auch Fas Kontakt mit den Zielzellen ausbildeten, in Kokultur große Zell-KaAPC-Aggregate formten. Das ließe vermuten, dass KaAPC in mehreren Zielzellen gleichzeitige Apoptose induzieren können und möglicherweise sogar in mehreren Zielzellen nacheinander.

In dieser Arbeit konnte das erste Mal die Generierung einer funktionellen, „bead“-basierten KaAPC gezeigt werden, die auf Grund ihres, aus einem antigenspezifischen und eines apoptoseinduzierenden Signal bestehenden, Phänotyps zur effizienten, antigenspezifischen Depletion von $CD8^+$ T-Zellen verwendet werden konnte. Die anschließenden *in vitro* Untersuchungen lieferten die Voraussetzungen für eine mögliche Verwendung dieser KaAPC zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen und Transplantatabstoßungsreaktionen.

4.3.3 Hinweise auf die molekulare Funktionsweise der KaAPC

Interessant, doch noch nicht geklärt, bleiben die molekularen Abläufe, die während der Elimination von $CD8^+$ T-Zellen durch KaAPC ablaufen. Betrachtet man die Menge des auf der KaAPC gebundenen α -Fas Antikörpers, so kann man eindeutig feststellen, dass nur bei Mengen zwischen $0.5 - 2 \mu\text{g} / 100 \times 10^6$ „beads“ die vermittelte Apoptose antigenspezifisch induziert wird. Überschreiten die α -Fas Antikörpermengen $2 \mu\text{g} / 100 \times 10^6$ „beads“ so wird die Apoptose generell in allen T-Zellen, also nicht mehr antigenspezifisch induziert. Eine mögliche Erklärung könnte hierfür im Aktivierungszustand der verwendeten T-Zellen liegen. Da diese durch wiederholte Stimulation mit aAPC einen aktivierten Phänotyp aufweisen und somit auch eine hochregulierte Fas-Expression in diesen Zellen vorliegt ließe sich die unspezifische Induktion von Apoptose durch die starken Affinitäten der zahlreichen Fas Moleküle auf der T-Zelloberfläche und des α -Fas Antikörpers auf der „bead“-Oberfläche erklären.

Werden T-Zellen über ein kombiniertes TCR - CD3 Signal aktiviert kommt es zur Ausbildung einer so genannten immunologischen Synapse. Grundlage hierfür ist die Verschmelzung von intrazellulären, lipidreichen und mit verschiedensten Rezeptormolekülen angereicherten Vesikeln mit der T-Zellmembran. Dieser Vorgang resultiert in der Aggregation verschiedener Signalmoleküle in einem vergleichsweise kleinem Bereich der T-Zelloberfläche, was eine

Interaktion zwischen T-Zelle und z.B. KaAPC durch die räumliche Nähe der Signale begünstigt²⁵². Somit könnte es bei einer KaAPC - T-Zellinteraktion zu einer besseren Trimerisierung der Fas-Moleküle auf der T-Zelloberfläche kommen und dadurch zum baldigen Zelltod. Eine mögliche antigenspezifische Variation des Signals durch die gebundenen HLA-A₂-Ig Dimer Moleküle würde jedoch durch diese starke Interaktion bzw. die große räumliche Nähe so vieler Fas Moleküle und α -Fas Antikörper auf der „bead“-Oberfläche einfach überschrieben werden.

Diese käme allerdings wieder zum Tragen, sobald der α -Fas Antikörper die kritische Menge von 2 $\mu\text{g}/100 \times 10^6$ „beads“ unterschreitet. In diesem Fall ist möglicherweise die spezifische Interaktion zwischen Fas und α -Fas Antikörpern zu schwach, bzw. die Mengen der einzelnen Fas Moleküle oder α -Fas Antikörper zu gering, um ohne eine weitere stabilisierende „bead“-T-Zellinteraktion, eine apoptoseauslösende Bindung zwischen KaAPC und T-Zelle herzustellen. Die notwendige Stabilisierung dieser Bindung könnte in dieser Situation durch die TCR – HLA-A₂-Ig Dimer Interaktion vermittelt werden. Diese sind allerdings nur dann ausreichend stark genug, wenn die HLA-A₂-Ig Dimer Moleküle mit den korrespondierenden Peptid beladen sind, was sich dann in der Induktion antigenspezifischer Apoptose in den jeweiligen T-Zellen widerspiegelt.

Doch auch bei diesem antigenspezifischen Signal scheint die Stärke von ausschlaggebender Bedeutung zu sein. Führt dieses bei geringen Mengen an gebundenem HLA-A₂-Ig Dimer auf der „bead“-Oberfläche noch zur ausreichenden Stabilisierung der KaAPC – T-Zellinteraktion und zur Induktion antigenspezifischer Apoptose, so geht dieser Effekt, bei immobilisierten Mengen an HLA-A₂-Ig Dimer, die 0,01 $\mu\text{g}/100 \times 10^6$ „beads“ übersteigen, vollständig verloren. Möglicherweise könnte die Kombination aus starker antigenspezifischer Bindung und schwächerer Fas Stimulation eher kostimulierend wirken. Diese Theorie würde durch Publikationen gestützt, die eine kostimulatorische Wirkung der Fas-Aktivierung beschreiben^{253,254}. Ebenso konnte gezeigt werden, dass in Kokulturen von T-Zellen mit 2 μg α -Fas Antikörper/ 100×10^6 „beads“ beschichteten „beads“ keinerlei Apoptoseinduktion detektiert werden konnte. Jedoch unspezifische Apoptose in T-Zellkokulturen mit 10 μg α -Fas Antikörper/ 100×10^6 „beads“ beschichteten „beads“ nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Da eine solche unspezifische Apoptoseinduktion ebenfalls in mit 8 μg α -Fas Antikörper/ 100×10^6 „beads“ und 0,01 μg HLA-A₂-Ig Dimer/ 100×10^6 „beads“ beschichteten KaAPC-Phänotypen beobachtet werden konnte (**Abbildung 11**) spräche dies für eine mögliche direkte Abhängigkeit der Wirkung des α -Fas Antikörpers auf die T-Zelle, von der Stärke und dem Vorhandenseins des antigenspezifischen Signals. Weiteren Aufschluss über

die molekulare Funktionsweise der KaAPC könnten Experimente ergeben, die die verschiedenen KaAPC-Phänotypen hinsichtlich ihrer aktivierungs- oder auch anergieinduzierenden Eigenschaften untersuchen. Erste Hinweise, dass keine Anergieinduktion in T-Zellen erfolgt, ergaben Kokultorexperimente mit naiven T-Zellen und KaAPC des optimalen Phänotyps. Aus den so behandelten T-Zellen war es anschließend noch möglich, durch repetitive aAPC Stimulationen antigenspezifische T-Zellen zu generieren (Daten nicht gezeigt). Das zeigte eindeutig die Limitation des in dieser Arbeit beschriebenen optimalen KaAPC-Phänotyps auf, der nicht zur Depletion von naiven antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen befähigt war, jedoch auch keine Anergie in antigenspezifischen CD8⁺ T-Vorläuferzellen induzierte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Funktionsweise des optimalen KaAPC-Phänotyps von einem hochsensiblen Gleichgewicht der verschiedenen Moleküle auf der „bead“-Oberfläche und deren Interaktion mit der T-Zelle abhängt. Darüber hinaus sind die unterschiedlichen Aktivierungszustände der einzelnen T-Zellkulturen ausschlaggebend für die optimale Funktionsweise der KaAPC.

4.3.4 Vorteile und Potential der KaAPC-Technologie

KaAPC weisen einige deutliche Vorteile gegenüber zellbasierten APC auf. So besteht bei den KaAPC nicht die Gefahr der Aktivierung einer Immunantwort oder der Toleranzinduktion gegenüber anderen Antigenen, die im Falle der APC noch zusätzlich zu dem geladenen Antigen präsentiert werden können. Im Gegensatz zu APC können KaAPC weder durch autokrine noch durch parakrine Effekte des Fas/FasL-Signalwegs durch Apoptose ausgeschaltet werden. Auch die zytotoxischen Effektorfunktionen von CTL können KaAPC nicht eliminieren, oder in ihrer Funktionsweise behindern. Darüber hinaus stellen KaAPC eine einfache und schnell modifizierbare Plattformtechnologie dar. Einerseits lässt sich ihr Phänotyp durch die einfache Beladung mit unterschiedlichen Peptiden variieren, andererseits ist die Verwendung unterschiedlicher apoptoseinduzierender Signale denkbar. Hierzu würden sich vor allem die Liganden oder Antikörper gegen die Rezeptoren der TNFR-Superfamilie eignen^{255,256}. Diese hoch variablen KaAPC-Phänotypen ließen sich schnell und vor allem mit gleichbleibender und reproduzierbarer Aktivität in großen Mengen herstellen. Da KaAPC auch keinen löslichen FasL bilden, kommt es nicht zur Verminderung der KaAPC vermittelten Apoptoseinduktion. Ebenso kann dadurch verhindert werden, dass bei einer verminderten FasL Expression eine Aktivierung und anschließenden Expansion von

antigenspezifischen T-Zellen vermittelt wird. Diese Gefahr bestünde jedoch bei der Verwendung von zellbasierten FasL-exprimierenden-APC. Zusammengefasst zeigen diese Vorteile den großen Nutzen der in dieser Arbeit entwickelten „bead“-basierten KaAPC.

Neben den vielen verschiedenen Ansätzen zu Depletion antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen^{188,189} gibt es experimentelle Ansätze, die die „bead“-basierte KaAPC in ihrer Funktionsweise komplementieren könnten. Tykocinski et al. konnten unter Verwendung eines CTLA-4/FasL-Ig Fusionsmoleküls in T-Zellen Fas/FasL vermittelte Apoptose induzieren. Dabei wurden durch Bindung des CTLA-4, an die B7.1 und B7.2 Moleküle auf den APC die kostimulatorische Interaktion von CD28 auf T-Zellen und B7 auf APC unterbunden. Die gleichzeitige Bindung von FasL an den auf aktivierten T-Zellen exprimierten Fas führte dann zu Apoptoseinduktion. Es wurde demonstriert, dass mittels dieses Fusionsproteins alloantigenspezifische T-Zellen *in vitro* depletiert werden kann. Ebenso konnte gezeigt werden, dass mittels des CTLA-4/FasL-Ig Fusionsprotein effizienter Apoptose in T-Zellen induziert werden konnte, als unter Verwendung von löslichen CTLA-4-Ig und/oder FasL-Ig²⁵⁷. Diese Resultate weisen darauf hin, dass die Kombination unterschiedlicher Signale zur effektiven Depletion von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen unbedingt notwendig ist und dass die Effektivität der KaAPC, möglicherweise über die Addition weiterer Signale zu dem in dieser Arbeit beschriebenen Phänotyp, noch gesteigert werden könnte.

4.4 Ausblick

In Anbetracht einer möglichen klinischen Anwendung der KaAPC könnte deren Vorteil, dass diese keine Antigene prozessieren und somit möglicherweise protektive Immunantworten eliminieren, als Nachteil ausgelegt werden. Dieser Umstand erfordert die Notwendigkeit der Identifizierung von relevanten, krankheitsspezifischen Antigenen. Jedoch sind auf diesem Gebiet in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht worden. Zu Zeit sind bereits viele HLA-A₂ restringierte Antigene für z.b. Typ-I-Diabetes²⁵⁸⁻²⁶³, Transplantatabstoßungsreaktionen^{264,265} und Multiple Sklerose^{266,267} beschrieben worden. Auch wird die Entschlüsselung des menschlichen Genoms die Identifizierung neuer Autoantigene noch weiter begünstigen²⁶⁸. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass zu Beginn einer Autoimmunerkrankung nur wenige autoreaktive T-Zellklone aktiviert werden und erst später im Verlauf der Krankheit weitere hinzukommen¹⁴³. Doch wichtiger als die Notwendigkeit der Antigenidentifizierung ist die Tatsache, dass auf den KaAPC jegliches

Signal beliebig in seiner Stärke und Zusammensetzung variiert werden kann. Ebenso unterliegen diese Signale keinen Genregulationsmechanismen und bleiben somit stabil und reproduzierbar.

Es wäre denkbar, dass die KaAPC-Technologie durch Hinzufügen eines HLA-Klasse-II Signals auch zur Eliminierung von antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen verwendet werden könnte. Selbst die Kombination von HLA-Klasse-I und -II Signalen wäre vorstellbar und möglicherweise von Vorteil²⁶⁹. Ebenso ließe sich über eine Verwendung dieser Technologie zur Depletion alloreaktiver T-Zellen visionieren. Da alloreaktive T-Zellen schon des öfteren *ex vivo* beschrieben, generiert und depletiert werden konnten²⁷⁰⁻²⁷⁶, würde die Kombination der unterschiedlichen HLA-Klasse-I- und -II-Moleküle eventuell deren vollständige Depletion begünstigen. Dies könnte die Behandlung von vor allem Transplantatabstoßungsreaktionen deutlich erleichtern und vor allem deren Auftreten minimieren.

Ebenso sollte in Zukunft über die Verwendung einer biodegradierbaren Basis für die KaAPC-Technologie nachgedacht werden. Zwar sind die verwendeten magnetischen „beads“ für *in vivo* Applikationen zugelassen, doch ist deren Auswirkung auf den Organismus nicht vollständig geklärt. Auch lässt sich durch die Natur dieser „beads“ leicht vermuten, dass berechnete Einwände gegen eine humane *in vivo* Applikation erhoben werden könnten. Hierzu würden sich, neben den schon heute in der Pharmazie verwendeten Systemen zur gezielten *in vivo* Applikation von Medikamenten²⁷⁷, vor allem Liposomen basierte KaAPC eignen. Die auf diesem Gebiet schon erzielten Erfolge bei der Generierung von aAPC^{185,191,204} lassen eine erfolgreiche Adaption dieses Konzepts für KaAPC günstig erscheinen. Dahingegen ist die Verwendung von Zellmatrix imitierenden Materialien eher unwahrscheinlich²⁷⁸.

Doch trotz aller möglichen Vorbehalte zur *in vivo* Applikation von KaAPC konnte in initialen Experimenten mit aAPC gezeigt werden, dass diese *in vivo* CTL aktivieren können. Ebenso konnten sowohl aAPC, als auch KaAPC nach intravenöser Gabe in unterschiedlichen Organen wiedergefunden werden (Lunge, Herz, Milz, Niere, Leber und Lymphknoten). Deshalb erscheinen auch *in vivo* Applikationen von KaAPC als eine mögliche Behandlungsstrategie von Autoimmunerkrankungen, nicht zu letzt deshalb, weil die „bead“-

Plattform, wie sie bei der KaAPC Verwendung findet, bereits in ersten *in vivo* Studien ihre Anwendung findet^{248,249,279}.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass „bead“-basierte HLA-A₂-Ig KaAPC antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen eliminieren können. Die einzigartige Natur dieser KaAPC-Technologie besitzt eine so hohe Flexibilität, dass neben der Stärke eines Signals auch neue völlig unterschiedliche Signale miteinander kombiniert werden können. Dies könnte eine gezielte Ausschaltung auch weiterer T-Zellsubpopulationen zur Behandlung von Immundefekten begünstigen. Somit konnte in dieser Arbeit das Potential der KaAPC-Technologie zur Behandlung von T-zellvermittelten Autoimmunkrankheiten, Transplantanabstoßungsreaktionen und chronischen Infekten aufgezeigt werden.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine „bead“-basierte Killer-artifizielle-antigenpräsentierende Zelle (KaAPC) generiert, die mittels des gebundenen HLA-A₂-Ig Dimers und des α -Fas Antikörpers, zur antigenspezifischen Ausschaltung von pathogenetisch relevanten antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen befähigt ist.

Nach anfänglicher Optimierung der Kulturbedingungen und der Ausschaltung der Effekte freien Peptids auf antigenspezifische CD8⁺ T-Zellkokulturen, wurden verschiedene KaAPC-Phänotypen hergestellt. Hierzu wurden unterschiedliche Mengen an HLA-A₂-Ig Dimer Molekülen und α -Fas Antikörpern auf der Oberfläche von paramagnetischen Epoxybeads immobilisiert. Die anschließende Evaluierung ergab einen optimalen, zur antigenspezifischen Eliminierung von CD8⁺ T-Zellen befähigten, KaAPC-Phänotyp mit definierten Mengen an HLA-A₂-Ig Dimer Molekülen und gleichzeitig gebundenem α -Fas Antikörper. Dieser wurde durchflusszytometrisch charakterisiert und sowohl im Mart-1 als auch im CMV_{pp65} humanen, antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellmodellsystem funktionell untersucht. Durch die Bestimmung der Apoptoseinduktion in humanen antigenspezifischen HLA-A₂ restringierten CD8⁺ T-Zellen nach Kokultur mit unterschiedlich beladenen KaAPC konnte gezeigt werden, dass KaAPC, beladen mit dem korrespondierenden Peptid, CD8⁺ T-Zellen antigenspezifisch depletieren können. Darüber hinaus ergaben weitere funktionelle Experimente, dass die Effizienz der KaAPC proportional zur eingesetzten Menge war und, dass die antigenspezifische Depletion schon nach 30 min Kontaktzeit zwischen KaAPC und CD8⁺ T-Zelle ausgelöst wurde. Ebenso konnte kein klassischer, aktivierungsinduzierter Zelltod (AICD) in den antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen nach Kokultur mit KaAPC nachgewiesen werden. Antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen exprimierten weder CD107a noch typische Effektorzytokine wie TNF- α nach Kontakt mit KaAPC. Kokulturen von KaAPC und antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen unter Zugabe eines neutralisierenden α -TNF- α Antikörpers zeigten keinerlei Auswirkung auf die durch KaAPC hervorgerufene Apoptoseinduktion. Kokulturen mit Kontrollbeads, die mit gleichen Mengen an HLA-A₂-Ig Dimer beschichtet waren, jedoch keinen α -Fas Antikörper besaßen, zeigten keine Apoptoseinduktion, die über den in den unstimulierten T-Zellkulturen gemessenen Hintergrund hinausging. Diese Ergebnisse zeigten deutlich, dass die erfolgreiche antigenspezifische Depletion von CD8⁺ T-Zellen sowohl vom Vorhandensein, als auch von

der Stärke eines antigenspezifischen (HLA-A₂-Ig Dimer) und eines Apoptose induzierenden Signals (α -Fas Antikörper) abhängt.

Um die potentielle therapeutische Anwendbarkeit der KaAPC weiter zu untermauern, wurde untersucht, ob diese antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen auch aus einem Gemisch unterschiedlicher T-Zellen mit verschiedenen Antigenspezifitäten depletieren werden konnten. Hierzu wurde unter zur Hilfenahme der beiden Membranfarbstoffe PKH67 und PKH26 und unter gleichzeitiger Verwendung von Annexin V und 7-ActinomycinD ein neuer durchflusszytometrischer Test entwickelt. Dieser erlaubte die gleichzeitige, voneinander getrennte Evaluation von Apoptoseraten in unterschiedlichen T-Zellpopulationen innerhalb desselben Ansatzes. Durch die Anwendung dieser neuen Methode konnte der Beweis erbracht werden, dass KaAPC antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen auch aus einem heterogenen Gemisch autologer Fas⁺ CD8⁺ T-Zellen mit unterschiedlichen Antigenspezifitäten eliminieren können. Für den in dieser Arbeit entwickelten, sowohl phänotypisch, als auch funktionell charakterisierten KaAPC-Phänotyp konnte somit der „proof of concept“ erbracht werden. Da KaAPC CD8⁺ T-Zellen antigenspezifisch eliminieren, stellen diese eine neue, vielversprechende Möglichkeit zur Modulation von T-Zellvermittelten Immunantworten da. Jedoch müssten vor einem potentiellen Einsatz der KaAPC-Technologie in der Klinik zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen, Transplantatabstoßungsreaktionen oder chronischen Infekten die *in vivo* Eigenschaften der KaAPC sorgfältig evaluiert werden.

Publikationsliste

Veröffentlichungen:

1. **Schütz, C.**, Fischer, K., Völkl, S., Hoves, S., Halbritter, D., Mackensen, A., Fleck, M.; A New Flow Cytometric Assay for the Simultaneous Analysis of Antigen Specific Elimination of T Cells in Heterogenous T Cell Populations. Journal of Immunological Methods, im Druck
2. **Schütz, C.**, Fleck, M., Mackensen, A., Zoso, A., Halbritter, D., Schneck, J.P., Oelke, M.; Killer-Artificial-Antigen-Presenting-Cells (KaAPC): A Novel Strategy to Delete Specific T Cells. Blood 2008, 111, 3546-52
3. Hoves, S., Krause, SW., **Schütz, C.**, Halbritter, D., Schölmerich, J., Herfarth, H., Fleck, M.; Monocyte-derived human macrophages mediate anergy in allogeneic T cells and induce regulatory T cells. J Immunol. 2006 Aug 15;177(4):2691-8
4. Mühlbauer, M., Fleck, M., **Schütz, C.**, Weiss, T., Froh, M., Blank, C., Schölmerich, J., Hellerbrand, C.; PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and-gamma and mediates T cell apoptosis. J Hepatol. 2006 Oct;45(4):520-8
5. Weigert, J., Neumeier, M., Schäffler, A., Fleck, M., Schölmerich, J., **Schütz, C.** and Buechler, C.; The adiponectin paralog CORS-26 has anti-inflammatory properties and is produced by human monocytic cells. FEBS Letters, Volume 579, Issue 25, 24 October 2005, Pages 5565-5570
6. Deml, L., Aigner, M., Decker, J., Eckhardt, A., **Schütz, C.**, Mittl, P., Barabas, S., Denk, S., Knoll, G., Lehn, N. and Schneider-Brachert, W.; Characterization of the *Helicobacter pylori* Cysteine-Rich Protein A as a T-Helper Cell Type 1 Polarizing Agent. Infect Immun. 2005 Aug; 73(8): 4732–4742.

Posterpräsentationen:

1. **Schütz, C.**, Fischer, K., Völkl, S., Hoves, S., Halbritter, D., Mackensen, A., Schölmerich, J., Fleck, M.; A New Flow Cytometric Assay for the Simultaneous Analysis of Antigen Specific Elimination of T Cells in Heterogenous T Cell Populations. 5th International Symposium on the Clinical Use of Cellular Products March 19 – 20. 2009, Erlangen, Germany, Book of abstracts A12
2. **Schütz, C.**, Fischer, K., Völkl, S., Hoves, S., Halbritter, D., Mackensen, A., Schölmerich, J., Fleck, M.; A New Flow – Cytometric - Assay for the Simultaneous Characterization of antigen-specific T - Cell Elimination in T - Cell Mixtures of diverse Antigen Specificities. 6th International Congress on Autoimmunity September 10.-14. 2008, Porto, Portugal, abstract # 149
3. Barabas, S., Halbritter, D., Deml, L., Schölmerich, J., Fleck, M., **Schütz, C.**; Expansion of GAD65₂₆₆₋₂₈₅ specific IFN- γ producing CD4⁺ Helper T Cells from Diabetic Patients and Healthy Controls. 6th International Congress on Autoimmunity September 10.-14. 2008, Porto, Portugal, abstract # 148
4. **Schütz, C.**, Fischer, K., Völkl, S., Hoves, S., Halbritter, D., Mackensen, A., Schölmerich, J., Fleck, M.; A New Flow Cytometric Assay for the Simultaneous Analysis of Antigen Specific Elimination of T Cells in Heterogenous T Cell Populations. Arthritis Rheum., 2008; 58(Suppl):S1849
5. **Schütz, C.**, Mackensen, A., Schneck, J.P., Schölmerich, J., Oelke, M., Fleck, M.; Antigen-specific CD8⁺ T cell depletion mediated by apoptosis-inducing HLA-A2-Ig based artificial APCs. 37th Annual Meeting of the German Society for Immunology Heidelberg, September 5. – 8. 2007, Germany
6. **Schütz, C.**, Mackensen, A., Halbritter, D., Fleck, M.; Fas Ligand (CD95L)-transduced monocyte-derived Killer-DC delete MelanA₂₆₋₃₅-specific CTL and are protected from CTL-mediated cytotoxicity. 13th International Congress of Immunology Rio de Janeiro, August 21. – 25. 2007, Brazil, Book of minisymposia S.26 (MS-18.7)

7. **Schütz, C.**, Mackensen, A., Schneck, J.P., Oelke, M., Fleck, M.; Killer-artificial-Antigen-Presenting-Cells (KaAPC): A novel tool for antigen-specific elimination of CD8⁺ T cells. 13th International Congress of Immunology Rio de Janeiro, August 21 - 25. 2007, Brazil, Book of poster abstracts S.60 (P0353)

8. **Schütz, C.**, Mackensen, A., Schneck, J., Schölmerich, J., Oelke, M., Fleck, M.; Antigen-specific elimination of CD8⁺ T cells using apoptosis-inducing artificial APCs. Cellular Therapy 2007, 4th International Symposium on the Clinical Use of Cellular Products March 22 – 23. 2007, Regensburg, Germany, Book of abstracts A24

9. **Schütz, C.**, Mackensen, A., Herfarth, H., Halbritter, D., Fleck, M.; Fas-Ligand (CD95L)- transduzierte, Monozyten generierte Killer-DC zerstören Melan-A-spezifische CD8⁺ T-Zellen und sind geschützt vor CTL vermittelter Zytotoxizität. 112. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DIGM), Wiesbaden, 22. – 26. April 2006, Med. Klinik 2006;101:90

10. **Schütz, C.**, Mackensen, A., Herfarth, H., Halbritter, D., Zhang, H.G., Mountz, J.D., Schölmerich, J. and Fleck, M.; Fas Ligand (CD95L) transduced monocyte-derived Killer-DC delete Melan-A-specific CD8⁺ T cells and are protected from CTL-induced cytotoxicity. Joint Annual Meeting of the German and Scandinavian Societies for Immunology, Kiel, 21. - 24.09.2005, Immunobiol. 210(2005): 506-507

11. **Schütz, C.**, Mackensen, A., Herfarth, H., Halbritter, D., Zhang, H.G., Mountz, J.D., Schölmerich, J., Fleck, M.; Fas ligand-transduced monocyte-derived killer-dendritic cells are protected from T cell-mediated cytotoxicity and delete antigen-specific CD8⁺ T cells. 69th Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology, San Diego, California, 12.-17.11.2005, Arthritis Rheum 2005;52(Suppl):S485

12. **Schuetz, C.**, Mackensen, A., Herfarth, H., Halbritter, D., Fleck, M.; Fas Ligand (CD95L) Transduced Monocyte-Derived Killer-DC Are Protected from CTL-Induced Cytotoxicity and Delete Melan-A-Specific CD8⁺ T Cells. FOCIS 2005, 5th Annual Meeting May 12.-16. 2005, Boston MA, Clin. Immunol., supplement 1 2005: S227

Vorträge:

1. **Schütz, C.**, Mackensen, A., Halbritter, D., Fleck, M.; Fas Ligand (CD95L)-transduced monocyte-derived Killer-DC delete MelanA₂₆₋₃₅-specific CTL and are protected from CTL-mediated cytotoxicity. 13th International Congress of Immunology Rio de Janeiro, August 21 - 25. 2007, Brazil, Book of minisymposia S.26 (MS-18.7)
2. **Schütz, C.**, Mackensen, A., Schneck, J.P., Schölmerich, J., Oelke, M. and Fleck, M.; Killer-artificial-Antigen-Presenting-Cells (KaAPC): A novel strategy to control T cell-mediated autoimmune responses. 5th International Congress on Autoimmunity, Sorrento, 29.11. – 3.12. 2006, Autoimmunity Rev. 2006; S197
3. **Schütz, C.**; The development and use of Killer-DC's. Regensburg: 28.10.2005 3rd Immunology Meeting

Literaturverzeichnis

1. Medzhitov, R. & Janeway, C., Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* **173**, 89-97 (2000).
2. Abbas, A.K. & Janeway, C.A., Jr. Immunology: improving on nature in the twenty-first century. *Cell* **100**, 129-38 (2000).
3. Refaeli, Y. & Abbas, A.K. Role of cytokines in autoimmunity. *Eur Cytokine Netw* **9**, 81-2 (1998).
4. Liu, Y.J. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* **106**, 259-62 (2001).
5. Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C. & Amigorena, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **20**, 621-67 (2002).
6. Appleman, L.J. & Boussiotis, V.A. T cell anergy and costimulation. *Immunol.Rev.* **192**, 161-180 (2003).
7. Chambers, C.A. The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited. *Trends Immunol* **22**, 217-23 (2001).
8. Sharpe, A.H. & Freeman, G.J. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* **2**, 116-26 (2002).
9. Jenkins, M.K. et al. In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu Rev Immunol* **19**, 23-45 (2001).
10. Andersson, K., Wrammert, J. & Leanderson, T. Affinity selection and repertoire shift: paradoxes as a consequence of somatic mutation? *Immunol Rev* **162**, 173-82 (1998).
11. Jameson, S.C. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol* **2**, 547-56 (2002).
12. Tanchot, C., Rosado, M.M., Agenes, F., Freitas, A.A. & Rocha, B. Lymphocyte homeostasis. *Semin Immunol* **9**, 331-7 (1997).
13. Sprent, J. & Surh, C.D. T cell memory. *Annu Rev Immunol* **20**, 551-79 (2002).
14. Budd, R.C. Activation-induced cell death. *Curr Opin Immunol* **13**, 356-62 (2001).
15. Van Parijs, L. & Abbas, A.K. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* **280**, 243-8 (1998).
16. Alderson, M.R. et al. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med* **181**, 71-7 (1995).
17. Dhein, J., Walczak, H., Baumler, C., Debatin, K.M. & Krammer, P.H. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* **373**, 438-41 (1995).
18. Ju, S.T. et al. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* **373**, 444-8 (1995).
19. Wallach, D. et al. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* **17**, 331-67 (1999).

20. Griffith, T.S. & Lynch, D.H. TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. *Curr Opin Immunol* **10**, 559-63 (1998).
21. Jaattela, M. & Tschopp, J. Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat Immunol* **4**, 416-23 (2003).
22. Guo, M. & Hay, B.A. Cell proliferation and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 745-52 (1999).
23. Arstila, T.P. et al. A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science* **286**, 958-61 (1999).
24. Kishimoto, H. & Sprent, J. The thymus and central tolerance. *Clin Immunol* **95**, S3-7 (2000).
25. Palmer, E. Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol* **3**, 383-91 (2003).
26. Goodnow, C.C., Sprent, J., Fazekas de St Groth, B. & Vinuesa, C.G. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* **435**, 590-7 (2005).
27. McCarty, N. et al. Signaling by the kinase MINK is essential in the negative selection of autoreactive thymocytes. *Nat Immunol* **6**, 65-72 (2005).
28. Dighiero, G. & Rose, N.R. Critical self-epitopes are key to the understanding of self-tolerance and autoimmunity. *Immunol Today* **20**, 423-8 (1999).
29. Goldrath, A.W. & Bevan, M.J. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* **402**, 255-62 (1999).
30. Semana, G., Gausling, R., Jackson, R.A. & Hafler, D.A. T cell autoreactivity to proinsulin epitopes in diabetic patients and healthy subjects. *J Autoimmun* **12**, 259-67 (1999).
31. Li, L. & Boussiotis, V.A. Physiologic regulation of central and peripheral T cell tolerance: lessons for therapeutic applications. *J Mol Med* **84**, 887-99 (2006).
32. Mondino, A., Khoruts, A. & Jenkins, M.K. The anatomy of T-cell activation and tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2245-52 (1996).
33. Walker, L.S. & Abbas, A.K. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol* **2**, 11-9 (2002).
34. Zinkernagel, R.M. Immunology taught by viruses. *Science* **271**, 173-8 (1996).
35. Alferink, J. et al. Control of neonatal tolerance to tissue antigens by peripheral T cell trafficking. *Science* **282**, 1338-41 (1998).
36. Kurts, C., Miller, J.F., Subramaniam, R.M., Carbone, F.R. & Heath, W.R. Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction. *J Exp Med* **188**, 409-14 (1998).
37. Schwartz, R.H. T cell clonal anergy. *Curr Opin Immunol* **9**, 351-7 (1997).
38. Colombetti, S., Benigni, F., Basso, V. & Mondino, A. Clonal anergy is maintained independently of T cell proliferation. *J Immunol* **169**, 6178-86 (2002).
39. Schwartz, R.H. T cell anergy. *Annu Rev Immunol* **21**, 305-34 (2003).

40. Jenkins, M.K. & Schwartz, R.H. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J Exp Med* **165**, 302-19 (1987).
41. Mahnke, K., Schmitt, E., Bonifaz, L., Enk, A.H. & Jonuleit, H. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol Cell Biol* **80**, 477-83 (2002).
42. Lutz, M. & Schuler, G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* **23**, 445 (2002).
43. Krummel, M.F. & Allison, J.P. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* **182**, 459-65 (1995).
44. Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N. & Honjo, T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* **11**, 141-51 (1999).
45. Tivol, E.A. et al. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* **3**, 541-7 (1995).
46. Waterhouse, P. et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science* **270**, 985-8 (1995).
47. Ueda, H. et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* **423**, 506-11 (2003).
48. Nielsen, C., Hansen, D., Husby, S., Jacobsen, B.B. & Lillevang, S.T. Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes. *Tissue Antigens* **62**, 492-7 (2003).
49. Prokunina, L. et al. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat Genet* **32**, 666-9 (2002).
50. Sharma, K. et al. Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacol Ther* **88**, 333-47 (2000).
51. Nagata, S. & Suda, T. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol Today* **16**, 39-43 (1995).
52. Badley, A.D. et al. Upregulation of Fas ligand expression by human immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected T lymphocytes. *J Virol* **70**, 199-206 (1996).
53. Suss, G. & Shortman, K. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J Exp Med* **183**, 1789-96 (1996).
54. Griffith, T.S., Brunner, T., Fletcher, S.M., Green, D.R. & Ferguson, T.A. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* **270**, 1189-1192 (1995).
55. Choi, C. & Benveniste, E.N. Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses. *Brain Res Brain Res Rev* **44**, 65-81 (2004).
56. Fisher, G.H. et al. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* **81**, 935-46 (1995).

57. Straus, S.E., Sneller, M., Lenardo, M.J., Puck, J.M. & Strober, W. An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Ann Intern Med* **130**, 591-601 (1999).
58. Baecher-Allan, C. & Anderson, D.E. Regulatory cells and human cancer. *Semin Cancer Biol* **16**, 98-105 (2006).
59. Chatila, T.A. Role of regulatory T cells in human diseases. *J Allergy Clin Immunol* **116**, 949-59; quiz 960 (2005).
60. Zenclussen, A.C. Regulatory T cells in pregnancy. *Springer Semin Immunopathol* **28**, 31-9 (2006).
61. Wood, K.J. & Sakaguchi, S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* **3**, 199-210 (2003).
62. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* **155**, 1151-64 (1995).
63. Sakaguchi, S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* **22**, 531-62 (2004).
64. Baecher-Allan, C. & Hafler, D.A. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol Rev* **212**, 203-16 (2006).
65. Fontenot, J.D., Gavin, M.A. & Rudensky, A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* **4**, 330-6 (2003).
66. Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057-61 (2003).
67. Sakaguchi, S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* **101**, 455-8 (2000).
68. Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H.L. & Hafler, D.A. Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* **199**, 971-9 (2004).
69. Lindley, S. et al. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* **54**, 92-9 (2005).
70. Kriegel, M.A. et al. Defective suppressor function of human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II. *J Exp Med* **199**, 1285-91 (2004).
71. Wildin, R.S. et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* **27**, 18-20 (2001).
72. Bennett, C.L. et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* **27**, 20-1 (2001).
73. Kretschmer, K. et al. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* **6**, 1219-27 (2005).

-
74. Chen, W. et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* **198**, 1875-86 (2003).
 75. Liang, S. et al. Conversion of CD4+ CD25- cells into CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo requires B7 costimulation, but not the thymus. *J Exp Med* **201**, 127-37 (2005).
 76. Walker, M.R. et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest* **112**, 1437-43 (2003).
 77. Piccirillo, C.A. & Shevach, E.M. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol* **167**, 1137-40 (2001).
 78. Thornton, A.M. & Shevach, E.M. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* **188**, 287-96 (1998).
 79. Lim, H.W., HILLSAMER, P., BANHAM, A.H. & KIM, C.H. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* **175**, 4180-3 (2005).
 80. Nakamura, K. et al. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol* **172**, 834-42 (2004).
 81. Ghiringhelli, F. et al. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med* **202**, 1075-85 (2005).
 82. Azuma, T., Takahashi, T., Kunisato, A., Kitamura, T. & Hirai, H. Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions. *Cancer Res* **63**, 4516-20 (2003).
 83. Misra, N., Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., Kazatchkine, M.D. & Kaveri, S.V. Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol* **172**, 4676-80 (2004).
 84. Kuniyasu, Y. et al. Naturally anergic and suppressive CD25(+)CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. *Int Immunol* **12**, 1145-55 (2000).
 85. Read, S., Malmstrom, V. & Powrie, F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* **192**, 295-302 (2000).
 86. Annacker, O. et al. CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol* **166**, 3008-18 (2001).
 87. Ostroukhova, M. et al. Treg-mediated immunosuppression involves activation of the Notch-HES1 axis by membrane-bound TGF-beta. *J Clin Invest* **116**, 996-1004 (2006).
 88. Piccirillo, C.A. et al. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med* **196**, 237-46 (2002).
 89. Zorn, E. et al. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* **108**, 1571-9 (2006).

90. Deaglio, S. et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* **204**, 1257-65 (2007).
91. Bopp, T. et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* **204**, 1303-10 (2007).
92. Mills, K.H. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* **4**, 841-55 (2004).
93. Baecher-Allan, C., Viglietta, V. & Hafler, D.A. Inhibition of human CD4(+)CD25(+high) regulatory T cell function. *J Immunol* **169**, 6210-7 (2002).
94. Suttmüller, R.P. et al. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest* **116**, 485-94 (2006).
95. Belkaid, Y. & Rouse, B.T. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* **6**, 353-60 (2005).
96. Carrier, Y., Yuan, J., Kuchroo, V.K. & Weiner, H.L. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. *J Immunol* **178**, 179-85 (2007).
97. Groux, H. et al. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**, 737-42 (1997).
98. Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J. & Enk, A.H. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* **192**, 1213-22 (2000).
99. Barrat, F.J. et al. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med* **195**, 603-16 (2002).
100. Bacchetta, R. et al. Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines. *Eur J Immunol* **32**, 2237-45 (2002).
101. Yudoh, K., Matsuno, H., Nakazawa, F., Yonezawa, T. & Kimura, T. Reduced expression of the regulatory CD4⁺ T cell subset is related to Th1/Th2 balance and disease severity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **43**, 617-27 (2000).
102. Weston, L.E., Geczy, A.F. & Briscoe, H. Production of IL-10 by alloreactive sibling donor cells and its influence on the development of acute GVHD. *Bone Marrow Transplant* **37**, 207-12 (2006).
103. VanBuskirk, A.M. et al. Human allograft acceptance is associated with immune regulation. *J Clin Invest* **106**, 145-55 (2000).
104. Saloga, J., Bellinghausen, I. & Knop, J. Do Tr1 cells play a role in immunotherapy? *Int Arch Allergy Immunol* **118**, 210-1 (1999).
105. Reefer, A.J. et al. A role for IL-10-mediated HLA-DR7-restricted T cell-dependent events in development of the modified Th2 response to cat allergen. *J Immunol* **172**, 2763-72 (2004).

106. MacDonald, A.J. et al. CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons. *J Infect Dis* **185**, 720-7 (2002).
107. Marshall, N.A. et al. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood* **103**, 1755-62 (2004).
108. Ciubotariu, R. et al. Detection of T suppressor cells in patients with organ allografts. *Hum Immunol* **62**, 15-20 (2001).
109. Ciubotariu, R. et al. Indirect allorecognition in heart allograft rejection. *Transplant Proc* **33**, 1612 (2001).
110. Bruzzone, P. et al. Organ allograft recipients develop HLA class I-specific T suppressor cells. *Transplant Proc* **33**, 78-9 (2001).
111. Liu, Z., Tugulea, S., Cortesini, R. & Suciuc-Foca, N. Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells. *Int Immunol* **10**, 775-83 (1998).
112. Ciubotariu, R. et al. Specific suppression of human CD4+ Th cell responses to pig MHC antigens by CD8+CD28- regulatory T cells. *J Immunol* **161**, 5193-202 (1998).
113. Chang, C.C. et al. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol* **3**, 237-43 (2002).
114. Ravetch, J.V. & Lanier, L.L. Immune inhibitory receptors. *Science* **290**, 84-9 (2000).
115. Filaci, G. et al. Impairment of CD8+ T suppressor cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* **166**, 6452-7 (2001).
116. Meloni, F. et al. Foxp3 expressing CD4+ CD25+ and CD8+CD28- T regulatory cells in the peripheral blood of patients with lung cancer and pleural mesothelioma. *Hum Immunol* **67**, 1-12 (2006).
117. Filaci, G. et al. Nonantigen specific CD8+ T suppressor lymphocytes originate from CD8+CD28- T cells and inhibit both T-cell proliferation and CTL function. *Hum Immunol* **65**, 142-56 (2004).
118. Afzali, B., Lechler, R.I. & Hernandez-Fuentes, M.P. Allorecognition and the alloresponse: clinical implications. *Tissue Antigens* **69**, 545-56 (2007).
119. Ibrahim, S., Dawson, D.V. & Sanfilippo, F. Predominant infiltration of rejecting human renal allografts with T cells expressing CD8 and CD45RO. *Transplantation* **59**, 724-8 (1995).
120. Nankivell, B.J. et al. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* **349**, 2326-33 (2003).
121. Fabre, J.W. The allogeneic response and tumor immunity. *Nat Med* **7**, 649-52 (2001).
122. Suchin, E.J. et al. Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question. *J Immunol* **166**, 973-81 (2001).
123. Gould, D.S. & Auchincloss, H., Jr. Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol Today* **20**, 77-82 (1999).

124. Auchincloss, H., Jr. et al. The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3373-7 (1993).
125. Barth, R., Counce, S., Smith, P. & Snell, G.D. Strong and weak histocompatibility gene differences in mice and their role in the rejection of homografts of tumors and skin. *Ann Surg* **144**, 198-204 (1956).
126. Davidson, A. & Diamond, B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med* **345**, 340-50 (2001).
127. Jacobson, D.L., Gange, S.J., Rose, N.R. & Graham, N.M. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol* **84**, 223-43 (1997).
128. Turley, S.J. Dendritic cells: inciting and inhibiting autoimmunity. *Curr Opin Immunol* **14**, 765-70 (2002).
129. Ermann, J. & Fathman, C.G. Autoimmune diseases: genes, bugs and failed regulation. *Nat Immunol* **2**, 759-61 (2001).
130. Zandman-Goddard, G. & Shoenfeld, Y. HIV and autoimmunity. *Autoimmun Rev* **1**, 329-37 (2002).
131. Lipsky, P.E. Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nat Immunol* **2**, 764-6 (2001).
132. Encinas, J.A. & Kuchroo, V.K. Mapping and identification of autoimmunity genes. *Curr Opin Immunol* **12**, 691-7 (2000).
133. O'Shea, J.J., Ma, A. & Lipsky, P. Cytokines and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* **2**, 37-45 (2002).
134. Wandstrat, A. & Wakeland, E. The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes. *Nat Immunol* **2**, 802-9 (2001).
135. Wucherpfennig, K.W. & Strominger, J.L. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* **80**, 695-705 (1995).
136. Wang, C.Y. et al. Characterization of mutations in patients with autoimmune polyglandular syndrome type 1 (APS1). *Hum Genet* **103**, 681-5 (1998).
137. Mountz, J.D., Bluethmann, H., Zhou, T. & Wu, J. Defective clonal deletion and anergy induction in TCR transgenic lpr/lpr mice. *Semin Immunol* **6**, 27-37 (1994).
138. Puck, J.M. & Sneller, M.C. ALPS: an autoimmune human lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis. *Semin Immunol* **9**, 77-84 (1997).
139. Rieux-Laucat, F., Fischer, A. & Deist, F.L. Cell-death signaling and human disease. *Curr Opin Immunol* **15**, 325-31 (2003).
140. Asano, M., Toda, M., Sakaguchi, N. & Sakaguchi, S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* **184**, 387-96 (1996).

141. Sugiyama, H. et al. Dysfunctional blood and target tissue CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol* **174**, 164-73 (2005).
142. Lanzavecchia, A. How can cryptic epitopes trigger autoimmunity? *J Exp Med* **181**, 1945-8 (1995).
143. Vanderlugt, C.L. & Miller, S.D. Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat.Rev.Immunol.* **2**, 85-95 (2002).
144. Tounouz, M., Donckier, V. & Goldman, M. Tolerance induction in clinical transplantation: the pending questions. *Transplantation* **75**, 58S-60S (2003).
145. Oberholzer, A. et al. Increased survival in sepsis by in vivo adenovirus-induced expression of IL-10 in dendritic cells. *J Immunol* **168**, 3412-8 (2002).
146. Sonderbye, L. et al. In vivo and in vitro modulation of immune stimulatory capacity of primary dendritic cells by adenovirus-mediated gene transduction. *Exp Clin Immunogenet* **15**, 100-11 (1998).
147. Takayama, T., Morelli, A.E., Robbins, P.D., Tahara, H. & Thomson, A.W. Feasibility of CTLA4Ig gene delivery and expression in vivo using retrovirally transduced myeloid dendritic cells that induce alloantigen-specific T cell anergy in vitro. *Gene Ther* **7**, 1265-73 (2000).
148. Song, K. et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression. *J Exp Med* **191**, 1095-104 (2000).
149. Liu, Z. et al. CII-DC-AdTRAIL cell gene therapy inhibits infiltration of CII-reactive T cells and CII-induced arthritis. *J Clin Invest* **112**, 1332-41 (2003).
150. Walczak, H. & Krammer, P.H. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* **256**, 58-66 (2000).
151. Nagata, S. Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet* **33**, 29-55 (1999).
152. Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S. & Peter, M.E. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* **254**, 439-59 (1998).
153. Cohen, G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* **326** (Pt 1), 1-16 (1997).
154. Nagata, S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* **256**, 12-8 (2000).
155. Ogasawara, J. et al. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* **364**, 806-9 (1993).
156. Kakinuma, C. et al. Acute toxicity of an anti-Fas antibody in mice. *Toxicol Pathol* **27**, 412-20 (1999).
157. Kosiewicz, M.M., Krishnan, A., Worthington, M.T., Matriano, J.A. & Ross, W.G. B cells engineered to express Fas ligand suppress pre-sensitized antigen-specific T cell responses in vivo. *Eur J Immunol* **32**, 1679-87 (2002).
158. Zhang, H.G. et al. Induction of specific T cell tolerance by Fas ligand-expressing antigen-presenting cells. *J.Immunol.* **162**, 1423-1430 (1999).

159. Buonocore, S. et al. Dendritic cells overexpressing CD95 (Fas) ligand elicit vigorous allospecific T-cell responses in vivo. *Blood* **101**, 1469-1476 (2003).
160. Min, W.P. et al. Dendritic cells genetically engineered to express Fas ligand induce donor-specific hyporesponsiveness and prolong allograft survival. *J.Immunol.* **164**, 161-167 (2000).
161. Zhang, H.G. et al. Antigen presenting cells expressing Fas ligand down-modulate chronic inflammatory disease in Fas ligand-deficient mice. *J.Clin.Invest* **105**, 813-821 (2000).
162. Matsue, H. et al. Induction of antigen-specific immunosuppression by CD95L cDNA-transfected 'killer' dendritic cells. *Nat.Med.* **5**, 930-937 (1999).
163. Kusuvara, M. et al. Killing of naive T cells by CD95L-transfected dendritic cells (DC): in vivo study using killer DC-DC hybrids and CD4(+) T cells from DO11.10 mice. *Eur.J.Immunol.* **32**, 1035-1043 (2002).
164. Wolfe, T. et al. Reduction of antiviral CD8 lymphocytes in vivo with dendritic cells expressing Fas ligand-increased survival of viral (lymphocytic choriomeningitis virus) central nervous system infection. *J.Immunol.* **169**, 4867-4872 (2002).
165. Wu, B. et al. Specific immunotherapy by genetically engineered APCs: the "guided missile" strategy. *J.Immunol.* **166**, 4773-4779 (2001).
166. Kim, S.H., Kim, S., Oligino, T.J. & Robbins, P.D. Effective treatment of established mouse collagen-induced arthritis by systemic administration of dendritic cells genetically modified to express FasL. *Mol Ther* **6**, 584-90 (2002).
167. Matsue, H. et al. Immunosuppressive properties of CD95L-transduced "killer" hybrids created by fusing donor- and recipient-derived dendritic cells. *Blood* **98**, 3465-3472 (2001).
168. Chuang, Y.H., Suen, J.L. & Chiang, B.L. Fas-ligand-expressing adenovirus-transfected dendritic cells decrease allergen-specific T cells and airway inflammation in a murine model of asthma. *J.Mol.Med.* **84**, 595-603 (2006).
169. Georgantas, R.W., III, Leong, K.W. & August, J.T. Antigen-specific induction of peripheral T cell tolerance in vivo by codelivery of DNA vectors encoding antigen and Fas ligand. *Hum.Gene Ther.* **11**, 851-858 (2000).
170. Hoves, S. et al. Mature but not immature Fas ligand (CD95L)-transduced human monocyte-derived dendritic cells are protected from Fas-mediated apoptosis and can be used as killer APC. *J.Immunol.* **170**, 5406-5413 (2003).
171. Hoves, S. et al. Elimination of activated but not resting primary human CD4+ and CD8+ T cells by Fas ligand (FasL/CD95L)-expressing Killer-dendritic cells. *Immunobiology* **208**, 463-475 (2004).
172. Hoves, S. et al. Alloantigen specific deletion of primary T cells by Fas ligand (FasL/CD95L)-transduced human monocyte-derived "Killer-DC". in *In Vorbereitung* (2004).
173. Dulat, H.J. et al. Down-regulation of human alloimmune responses by genetically engineered expression of CD95 ligand on stimulatory and target cells. *Eur.J.Immunol.* **31**, 2217-2226 (2001).

-
174. Strauss, G. et al. Membrane-bound CD95 ligand expressed on human antigen-presenting cells prevents alloantigen-specific T cell response without impairment of viral and third-party T cell immunity. *Cell Death.Differ.* (2006).
175. Dulat, H.J. et al. Down-regulation of human alloimmune responses by genetically engineered expression of CD95 ligand on stimulatory and target cells. *Eur J Immunol* **31**, 2217-26 (2001).
176. Whartenby, K.A. et al. Transduction of donor hematopoietic stem-progenitor cells with Fas ligand enhanced short-term engraftment in a murine model of allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **100**, 3147-3154 (2002).
177. Elhalel, M.D., Huang, J.H., Schmidt, W., Rachmilewitz, J. & Tykocinski, M.L. CTLA-4. FasL induces alloantigen-specific hyporesponsiveness. *J.Immunol.* **170**, 5842-5850 (2003).
178. Yolcu, E.S., Askenasy, N., Singh, N.P., Cherradi, S.E. & Shirwan, H. Cell membrane modification for rapid display of proteins as a novel means of immunomodulation: FasL-decorated cells prevent islet graft rejection. *Immunity*. **17**, 795-808 (2002).
179. Yagita, H., Seino, K., Kayagaki, N. & Okumura, K. CD95 ligand in graft rejection. *Nature* **379**, 682 (1996).
180. Lau, H.T., Yu, M., Fontana, A. & Stoeckert, C.J., Jr. Prevention of islet allograft rejection with engineered myoblasts expressing FasL in mice. *Science* **273**, 109-112 (1996).
181. Zhang, J. et al. Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* **166**, 6-10 (2001).
182. Askenasy, N., Yolcu, E.S., Yaniv, I. & Shirwan, H. Induction of tolerance using Fas ligand: a double-edged immunomodulator. *Blood* **105**, 1396-1404 (2005).
183. Hermans, I.F., Ritchie, D.S., Yang, J., Roberts, J.M. & Ronchese, F. CD8+ T cell-dependent elimination of dendritic cells in vivo limits the induction of antitumor immunity. *J.Immunol.* **164**, 3095-3101 (2000).
184. Constantin, C.M., Bonney, E.E., Altman, J.D. & Strickland, O.L. Major histocompatibility complex (MHC) tetramer technology: an evaluation. *Biol Res Nurs* **4**, 115-27 (2002).
185. Prakken, B. et al. Artificial antigen-presenting cells as a tool to exploit the immune 'synapse'. *Nat Med* **6**, 1406-10 (2000).
186. Dal Porto, J. et al. A soluble divalent class I major histocompatibility complex molecule inhibits alloreactive T cells at nanomolar concentrations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 6671-6675 (1993).
187. Maile, R. et al. Antigen-specific modulation of an immune response by in vivo administration of soluble MHC class I tetramers. *J Immunol* **167**, 3708-14 (2001).
188. Yuan, R.R. et al. Targeted deletion of T-cell clones using alpha-emitting suicide MHC tetramers. *Blood* **104**, 2397-2402 (2004).
189. Hess, P.R. et al. Selective deletion of antigen-specific CD8+ T cells by MHC class I tetramers coupled to the type I ribosome-inactivating protein saporin. *Blood* **109**, 3300-7 (2007).

190. Xu, X.N. et al. A novel approach to antigen-specific deletion of CTL with minimal cellular activation using alpha3 domain mutants of MHC class I/peptide complex. *Immunity* **14**, 591-602 (2001).
191. van Rensen, A.J., Wauben, M.H., Grosfeld-Stulemeyer, M.C., van Eden, W. & Crommelin, D.J. Liposomes with incorporated MHC class II/peptide complexes as antigen presenting vesicles for specific T cell activation. *Pharm Res* **16**, 198-204 (1999).
192. Kalamasz, D. et al. Optimization of human T-cell expansion ex vivo using magnetic beads conjugated with anti-CD3 and Anti-CD28 antibodies. *J Immunother* **27**, 405-18 (2004).
193. Latouche, J.B. & Sadelain, M. Induction of human cytotoxic T lymphocytes by artificial antigen-presenting cells. *Nat Biotechnol* **18**, 405-9 (2000).
194. Oelke, M. & Schneck, J.P. HLA-Ig-based artificial antigen-presenting cells: setting the terms of engagement. *Clin Immunol* **110**, 243-51 (2004).
195. Oosten, L.E. et al. Artificial antigen-presenting constructs efficiently stimulate minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood* **104**, 224-6 (2004).
196. Kim, J.V., Latouche, J.B., Riviere, I. & Sadelain, M. The ABCs of artificial antigen presentation. *Nat Biotechnol* **22**, 403-10 (2004).
197. Maus, M.V. et al. Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor, CD28 and 4-1BB. *Nat Biotechnol* **20**, 143-8 (2002).
198. Maus, M.V., Riley, J.L., Kwok, W.W., Nepom, G.T. & June, C.H. HLA tetramer-based artificial antigen-presenting cells for stimulation of CD4+ T cells. *Clin.Immunol.* **106**, 16-22 (2003).
199. Thomas, A.K., Maus, M.V., Shalaby, W.S., June, C.H. & Riley, J.L. A cell-based artificial antigen-presenting cell coated with anti-CD3 and CD28 antibodies enables rapid expansion and long-term growth of CD4 T lymphocytes. *Clin Immunol* **105**, 259-72 (2002).
200. Walter, S. et al. Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. *J Immunol* **171**, 4974-8 (2003).
201. Tham, E.L., Jensen, P.L. & Mescher, M.F. Activation of antigen-specific T cells by artificial cell constructs having immobilized multimeric peptide-class I complexes and recombinant B7-Fc proteins. *J Immunol Methods* **249**, 111-9 (2001).
202. Curtsinger, J., Deeths, M.J., Pease, P. & Mescher, M.F. Artificial cell surface constructs for studying receptor-ligand contributions to lymphocyte activation. *J Immunol Methods* **209**, 47-57 (1997).
203. Sasawatari, S. et al. Efficient priming and expansion of antigen-specific CD8+ T cells by a novel cell-based artificial APC. *Immunol Cell Biol* **84**, 512-21 (2006).
204. Zappasodi, R. et al. The effect of artificial antigen-presenting cells with preclustered anti-CD28/-CD3/-LFA-1 monoclonal antibodies on the induction of ex vivo expansion of functional human antitumor T cells. *Haematologica* **93**, 1523-34 (2008).
205. Krammer, P.H. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**, 789-795 (2000).

-
206. Zhang, H.G. et al. Induction of specific T-cell tolerance by adenovirus-transfected, Fas ligand-producing antigen presenting cells. *Nat.Biotechnol.* **16**, 1045-1049 (1998).
207. Zhan, H.G., Mountz, J.D., Fleck, M., Zhou, T. & Hsu, H.C. Specific deletion of autoreactive T cells by adenovirus-transfected, Fas ligand-producing antigen-presenting cells. *Immunol Res* **26**, 235-46 (2002).
208. Hsu, H.C. et al. Defective Fas ligand-mediated apoptosis predisposes to development of a chronic erosive arthritis subsequent to Mycoplasma pulmonis infection. *Arthritis Rheum* **44**, 2146-59 (2001).
209. Buonocore, S. et al. Dendritic cells overexpressing Fas-ligand induce pulmonary vasculitis in mice. *Clin.Exp.Immunol.* **137**, 74-80 (2004).
210. Oelke, M. et al. Ex vivo induction and expansion of antigen-specific cytotoxic T cells by HLA-Ig-coated artificial antigen-presenting cells. *Nat.Med.* **9**, 619-624 (2003).
211. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. & Reutelingsperger, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* **184**, 39-51 (1995).
212. Vermes, I., Haanen, C. & Reutelingsperger, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J.Immunol.Methods* **243**, 167-190 (2000).
213. Hoves, S. et al. Alloantigen specific deletion of primary human T cells by CD95- but not TRAIL-receptor signaling. in *American Association of Immunology*, 20.-24.04.2002 (New Orleans, U.S.A., 2002).
214. Greten, T.F. et al. Direct visualization of antigen-specific T cells: HTLV-1 Tax11-19-specific CD8(+) T cells are activated in peripheral blood and accumulate in cerebrospinal fluid from HAM/TSP patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7568-73 (1998).
215. Walden, P.R. & Eisen, H.N. Cognate peptides induce self-destruction of CD8+ cytolytic T lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**, 9015-9019 (1990).
216. Pemberton, R.M., Wraith, D.C. & Askonas, B.A. Influenza peptide-induced self-lysis and down-regulation of cloned cytotoxic T cells. *Immunology* **70**, 223-229 (1990).
217. Betts, M.R. et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J.Immunol.Methods* **281**, 65-78 (2003).
218. Burkett, M.W., Shafer-Weaver, K.A., Strobl, S., Baseler, M. & Malyguine, A. A novel flow cytometric assay for evaluating cell-mediated cytotoxicity. *J Immunother* **28**, 396-402 (2005).
219. Ohshima, Y. et al. Naive human CD4+ T cells are a major source of lymphotoxin alpha. *J Immunol* **162**, 3790-4 (1999).
220. Sung, S.S., Bjorndahl, J.M., Wang, C.Y., Kao, H.T. & Fu, S.M. Production of tumor necrosis factor/cachectin by human T cell lines and peripheral blood T lymphocytes stimulated by phorbol myristate acetate and anti-CD3 antibody. *J Exp Med* **167**, 937-53 (1988).
221. Yang, Y., Chang, J.F., Parnes, J.R. & Fathman, C.G. T cell receptor (TCR) engagement leads to activation-induced splicing of tumor necrosis factor (TNF) nuclear pre-mRNA. *J Exp Med* **188**, 247-54 (1998).

-
222. Aggarwal, B.B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* **3**, 745-56 (2003).
223. Ruddle, N.H. Tumor necrosis factor (TNF-alpha) and lymphotoxin (TNF-beta). *Curr Opin Immunol* **4**, 327-32 (1992).
224. Smyth, M.J. & Johnstone, R.W. Role of TNF in lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Microsc Res Tech* **50**, 196-208 (2000).
225. Cerottini, J.C. & Brunner, K.T. Cell-mediated cytotoxicity, allograft rejection, and tumor immunity. *Adv Immunol* **18**, 67-132 (1974).
226. Mantovani, A., Jerrells, T.R., Dean, J.H. & Herberman, R.B. Cytolytic and cytostatic activity on tumor cells of circulating human monocytes. *Int J Cancer* **23**, 18-27 (1979).
227. Hoves, S., Krause, S.W., Scholmerich, J. & Fleck, M. The JAM-assay: optimized conditions to determine death-receptor-mediated apoptosis. *Methods* **31**, 127-134 (2003).
228. Patel, A.K. & Boyd, P.N. An improved assay for antibody dependent cellular cytotoxicity based on time resolved fluorometry. *J Immunol Methods* **184**, 29-38 (1995).
229. Lichtenfels, R., Biddison, W.E., Schulz, H., Vogt, A.B. & Martin, R. CARE-LASS (calcein-release-assay), an improved fluorescence-based test system to measure cytotoxic T lymphocyte activity. *J Immunol Methods* **172**, 227-39 (1994).
230. Mattis, A.E., Bernhardt, G., Lipp, M. & Forster, R. Analyzing cytotoxic T lymphocyte activity: a simple and reliable flow cytometry-based assay. *J Immunol Methods* **204**, 135-42 (1997).
231. Aubry, J.P. et al. Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity. *Cytometry* **37**, 197-204 (1999).
232. Flieger, D. et al. Enhancement of antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) by combination of cytokines. *Hybridoma* **18**, 63-8 (1999).
233. Fischer, K., Andreesen, R. & Mackensen, A. An improved flow cytometric assay for the determination of cytotoxic T lymphocyte activity. *J Immunol Methods* **259**, 159-69 (2002).
234. Fischer, K. & Mackensen, A. The flow cytometric PKH-26 assay for the determination of T-cell mediated cytotoxic activity. *Methods* **31**, 135-142 (2003).
235. Young, A.J. & Hay, J.B. Rapid turnover of the recirculating lymphocyte pool in vivo. *Int Immunol* **7**, 1607-15 (1995).
236. Rosenblatt-Velin, N. et al. Transformed and nontransformed human T lymphocytes migrate to skin in a chimeric human skin/SCID mouse model. *J Invest Dermatol* **109**, 744-50 (1997).
237. Yamamura, Y. et al. A new flow cytometric method for quantitative assessment of lymphocyte mitogenic potentials. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **41 Suppl 1**, S121-32 (1995).

-
238. Sheehy, M.E., McDermott, A.B., Furlan, S.N., Klenerman, P. & Nixon, D.F. A novel technique for the fluorometric assessment of T lymphocyte antigen specific lysis. *J Immunol Methods* **249**, 99-110 (2001).
239. Ratta, M. et al. Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. *Blood* **100**, 230-7 (2002).
240. Ruffini, P.A. & Kwak, L.W. Immunotherapy of multiple myeloma. *Semin Hematol* **38**, 260-7 (2001).
241. Della Bella, S. et al. Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. *Br J Cancer* **89**, 1463-72 (2003).
242. Levine, B.L. et al. Large-scale production of CD4+ T cells from HIV-1-infected donors after CD3/CD28 costimulation. *J Hematother* **7**, 437-48 (1998).
243. Schilbach, K. et al. Cytotoxic minor histocompatibility antigen HA-1-specific CD8+ effector memory T cells: artificial APCs pave the way for clinical application by potent primary in vitro induction. *Blood* **106**, 144-9 (2005).
244. Yee, C. et al. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16168-73 (2002).
245. Mackensen, A. et al. Phase I study of adoptive T-cell therapy using antigen-specific CD8+ T cells for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* **24**, 5060-9 (2006).
246. Hunder, N.N. et al. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *N Engl J Med* **358**, 2698-703 (2008).
247. Bollard, C.M. et al. Cytotoxic T lymphocyte therapy for Epstein-Barr virus+ Hodgkin's disease. *J Exp Med* **200**, 1623-33 (2004).
248. Lu, X., Jiang, X., Liu, R., Zhao, H. & Liang, Z. Adoptive transfer of pTRP2-specific CTLs expanding by bead-based artificial antigen-presenting cells mediates anti-melanoma response. *Cancer Lett* **271**, 129-39 (2008).
249. Durai, M. et al. In vivo functional efficacy of tumor-specific T cells expanded using HLA-Ig based artificial antigen presenting cells (aAPC). *Cancer Immunol Immunother* **58**, 209-20 (2009).
250. Rubio, V. et al. Ex vivo identification, isolation and analysis of tumor-cytolytic T cells. *Nat Med* **9**, 1377-82 (2003).
251. Brehm, M.A., Daniels, K.A. & Welsh, R.M. Rapid production of TNF-alpha following TCR engagement of naive CD8 T cells. *J. Immunol.* **175**, 5043-5049 (2005).
252. Simons, K. & Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 31-9 (2000).
253. Rethi, B. et al. Priming of T cells to Fas-mediated proliferative signals by interleukin-7. *Blood* **112**, 1195-204 (2008).
254. Puliaeva, I., Puliaev, R., Shustov, A., Haas, M. & Via, C.S. Fas expression on antigen-specific T cells has costimulatory, helper, and down-regulatory functions in vivo for cytotoxic T cell responses but not for T cell-dependent B cell responses. *J Immunol* **181**, 5912-29 (2008).

-
255. Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell* **88**, 355-365 (1997).
256. Shen, H.M. & Pervaiz, S. TNF receptor superfamily-induced cell death: redox-dependent execution. *FASEB J.* **20**, 1589-1598 (2006).
257. Huang, J.H. & Tykocinski, M.L. CTLA-4-Fas ligand functions as a trans signal converter protein in bridging antigen-presenting cells and T cells. *Int.Immunol.* **13**, 529-539 (2001).
258. van Endert, P. et al. HLA class I epitope discovery in type 1 diabetes. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **1079**, 190-197 (2006).
259. Toma, A. et al. Recognition of a subregion of human proinsulin by class I-restricted T cells in type 1 diabetic patients. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102**, 10581-10586 (2005).
260. Pinkse, G.G. et al. Autoreactive CD8 T cells associated with beta cell destruction in type 1 diabetes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102**, 18425-18430 (2005).
261. Panagiotopoulos, C., Qin, H., Tan, R. & Verchere, C.B. Identification of a beta-cell-specific HLA class I restricted epitope in type 1 diabetes. *Diabetes* **52**, 2647-2651 (2003).
262. Panina-Bordignon, P. et al. Cytotoxic T cells specific for glutamic acid decarboxylase in autoimmune diabetes. *J.Exp.Med.* **181**, 1923-1927 (1995).
263. Di Lorenzo, T.P., Peakman, M. & Roep, B.O. Translational mini-review series on type 1 diabetes: Systematic analysis of T cell epitopes in autoimmune diabetes. *Clin.Exp.Immunol.* **148**, 1-16 (2007).
264. den Haan, J.M. et al. The minor histocompatibility antigen HA-1: a diallelic gene with a single amino acid polymorphism. *Science* **279**, 1054-1057 (1998).
265. Rufer, N. et al. HA-1 and the SMCY-derived peptide FIDSYICQV (H-Y) are immunodominant minor histocompatibility antigens after bone marrow transplantation. *Transplantation* **66**, 910-916 (1998).
266. Niland, B., Banki, K., Biddison, W.E. & Perl, A. CD8+ T cell-mediated HLA-A*0201-restricted cytotoxicity to transaldolase peptide 168-176 in patients with multiple sclerosis. *J.Immunol.* **175**, 8365-8378 (2005).
267. Zang, Y.C. et al. Increased CD8+ cytotoxic T cell responses to myelin basic protein in multiple sclerosis. *J.Immunol.* **172**, 5120-5127 (2004).
268. Hershko, A.Y. & Naparstek, Y. Autoimmunity in the era of genomics and proteomics. *Autoimmun.Rev.* **5**, 230-233 (2006).
269. Peakman, M. & Dayan, C.M. Antigen-specific immunotherapy for autoimmune disease: fighting fire with fire? *Immunology* **104**, 361-6 (2001).
270. Dutoit, V., Guillaume, P., Romero, P., Cerottini, J.C. & Valmori, D. Functional analysis of HLA-A*0201/Melan-A peptide multimer+ CD8+ T cells isolated from an HLA-A*0201- donor: exploring tumor antigen allorestricted recognition. *Cancer Immun* **2**, 7 (2002).
271. Moris, A., Teichgraber, V., Gauthier, L., Buhring, H.J. & Rammensee, H.G. Cutting edge: characterization of allorestricted and peptide-selective alloreactive T cells using HLA-tetramer selection. *J Immunol* **166**, 4818-21 (2001).

-
272. Pittet, M.J. et al. Ex vivo characterization of allo-MHC-restricted T cells specific for a single MHC-peptide complex. *J Immunol* **176**, 2330-6 (2006).
273. Weng, X. et al. Allo-restricted CTLs generated by coculturing of PBLs and autologous monocytes loaded with allogeneic peptide/HLA/IgG1-Fc fusion protein. *J Leukoc Biol* **85**, 574-81 (2009).
274. Godfrey, W.R., Krampf, M.R., Taylor, P.A. & Blazar, B.R. Ex vivo depletion of alloreactive cells based on CFSE dye dilution, activation antigen selection, and dendritic cell stimulation. *Blood* **103**, 1158-65 (2004).
275. Blanco, B. et al. Bortezomib induces selective depletion of alloreactive T lymphocytes and decreases the production of Th1 cytokines. *Blood* **107**, 3575-83 (2006).
276. Amrolia, P.J. et al. Selective depletion of donor alloreactive T cells without loss of antiviral or antileukemic responses. *Blood* **102**, 2292-9 (2003).
277. Hild, W.A., Breunig, M. & Goepferich, A. Quantum dots - nano-sized probes for the exploration of cellular and intracellular targeting. *Eur J Pharm Biopharm* **68**, 153-68 (2008).
278. Fadel, T.R. et al. Enhanced cellular activation with single walled carbon nanotube bundles presenting antibody stimuli. *Nano Lett* **8**, 2070-6 (2008).
279. Goldberg, J., Shrikant, P. & Mescher, M.F. In vivo augmentation of tumor-specific CTL responses by class I/peptide antigen complexes on microspheres (large multivalent immunogen). *J.Immunol.* **170**, 228-235 (2003).

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1:	Konzept des „Dritten Signals“.	17
Abbildung 2:	Reinheit der sortierten humanen CD8 ⁺ CTL	34
Abbildung 3:	Antigenspezifische CD8 ⁺ CTL zur Durchführung von funktionellen Assays	35
Abbildung 4:	Exemplarische Annexin V und Propidiumjodid (PI) Färbung	38
Abbildung 5:	Exemplarische Darstellung von PKH67 bzw. PKH26 gefärbten antigenspezifischen CD8 ⁺ CTL	39
Abbildung 6:	Schematische Darstellung eines HLA-A ₂ -Ig Dimer Moleküls.	41
Abbildung 7:	Schematische Darstellung des Konzepts zur Generierung von KaAPC und Kontrollbeads (c.b.).	42
Abbildung 8:	Evaluierung des T-Zell-Kokulturmediums mit der geringsten Hintergrundapoptose	43
Abbildung 9:	Peptidtitrationskurve zur Ermittlung der geringsten, in antigenspezifischen CTL noch Apoptose induzierenden Konzentration an korrespondierendem Peptid	45
Abbildung 10:	Ermittlung der Toxizität verbleibender Peptidmengen in den Beladungsansätzen der KaAPC und c.b.	47
Abbildung 11:	Titration der einzelnen Effektormoleküle auf den KaAPC zur Ermittlung eines funktionellen Phänotyps	50
Abbildung 12:	Durchflusszytometrischer Phänotyp einer funktionellen KaAPC	52
Abbildung 13:	Antigenspezifische Eliminierung von CTL nach Kokultur mit KaAPC	54

Abbildung 14:	Untersuchung des Einflusses des „bead“ : CTL Verhältnisses auf die Funktion der KaAPC	55
Abbildung 15:	Die Eliminierung der antigenspezifischen CTL in Kokultur mit KaAPC erfolgt schon innerhalb der ersten 30 Minuten	57
Abbildung 16:	„bead“ – CTL Kontakt führt nicht zur Aktivierung der antigenspezifischen CTL	59
Abbildung 17:	Die in Kokulturen mit spezifisch beladenen KaAPC dedektierte Eliminierung von antigenspezifischen CTL ist nicht TNF- α vermittelt	61
Abbildung 18:	Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs und der Auswertestrategie eines PKH67/26 Assays	64
Abbildung 19:	KaAPC depletieren CTL aus einem heterogenen Gemisch unterschiedlicher Antigenspezifitäten.	66
Tabelle 1:	Übersicht über die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der einzelnen immobilisierten Effektormoleküle auf den unterschiedlichen KaAPC Phänotypen	49

Danksagung

Diese Arbeit wurde im Zeitraum vom Juni 2004 bis April 2009 am Institut für Innere Medizin I der Universität Regensburg angefertigt. Zwischen November 2004 – Mai 2005 und Juni 2005 – August 2005 wurden Teile dieser Arbeit an der Johns Hopkins School of Medicine erarbeitet.

Herrn Prof. Dr. Martin Fleck danke ich für fachlich und menschlich hervorragende Betreuung, für die Unterstützung in schweren Zeiten und seine immerwährende Begeisterung.

Herrn Prof. Dr. Richard Warth danke ich für die bereitwillige Vertretung der Arbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg.

Dagmar Halbritter danke ich für die vielen Stunden in ein- und gemeinsamer Arbeit, die Vieles erst in der hier vorliegenden Form ermöglicht haben.

Dr. Mathias Ölke danke ich für die schöne und erfolgreiche gemeinsame Zeit in Baltimore und vor allem für die ganze Vormittage füllenden Diskussionen.

Ph.D., M.D. Jonathan P. Schneck danke ich für die offene Aufnahme in seinem Labor und die ständige Unterstützung während der Umsetzung des Projekts.

Für die praktischen Hilfestellungen und wissenschaftlichen Hinweise bedanke ich mich bei Prof. Dr. Andreas Mackensen, PD Dr. Ludwig Deml, Dr. Sascha Barabas alias Schatzi, Dr. Reinhart Meyer, Dr. Simon Völkl, Dr. Michael Aigner, Dr. Karin Fischer, Dr. Sabine Hoves, Dr. Alessia Zoso, Ph.D. „Joanie“ Bieler und Drew Bennet.

Außer den Genannten danke ich allen in irgendeiner Form an dieser Arbeit beteiligten Personen, die für ein entspanntes und angenehmes Arbeitsklima sorgten.

Nonno Gigi danke ich für den Schreibtisch an dem ich ausreichend Ruhe fand diese Arbeit zu vollenden.